خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۲ تابستان ۹۴ (۱۶۲-۱۵۳)
مقاله پژوهشی

اثر فرآیند کاهش لکوسیتی پیش از ذخیره بر سطوح بیان و ریزش رسپتور پیش التهابی P-Selectin در فرآورده‌های پلاکت رندوم حاصله از PRP

مهدیه مهرپوری[۱]، احترام‌السادات حسینی[۲]، صدیقه امینی کافی‌آباد[۳]، مهران قاسم‌زاده[۴]

چکیده

سابقه و هدف

عملکرد پلاکت‌ها در زمان نگهداری، متاثر از آسیب‌های دوران نگهداری می‌باشد که در میان شاخص‌های آن، بررسی تغییرات P-Selestin اهمیت به سزایی دارد. لذا برای ارزیابی کارآیی فرآورده‌های پلاکتی، بیان و ریزش این مارکر در پلاکت‌های فیلتر شده و عادی سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی ـ کاربردی، ۱۰ کیسه کنسانتره پلاکتی از پایگاه تهران تهیه و ۵ روز نگهداری شدند. نیمی تحت فیلتراسیون کاهش لکوسیتی قرار گرفتند. ۵ کیسه خون کامل منبع تهیه پلاکت کنترل بودند. از فلوسایتومتری و الایزا، به ترتیب برای بیان و ریزش مارکر P-Selectin استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها، نرم‌افزار Graphpad و آزمون‌های Anova-one way و Mann-Whitney U test استفاده شد.

یافته‌ها

بیان P-Selectin فرآورده‌های فیلتر شده در روزهای ۱، ۳ و ۵ به ترتیب ۱/۸٪ ± ۱۳/۵٪ ، ۱/۲٪ ± ۱۵/۲٪ و ۲/۵٪ ± ۲۷/۴٪ بود که در روز پنجم نسبت به سوم و اول افزایش معناداری داشت. در فرآورده‌های معمولی، بیان P-Selectin در روزهای ۱، ۳ و ۵ به ترتیب ۱/۷٪ ± ۷/۴٪، ۲٪ ± ۲۱٪ و ۲/۲٪ ± ۱۰٪ بود که روز سوم نسبت به اول افزایش و پنجم نسبت به سوم کاهش معناداری داشت. این کاهش می‌تواند به دلیل از دست رفتن رسپتورها حین ریزش و یا میکروپارتیکولاسیون متعاقب فعالیت شدید پلاکتی باشد. بررسی ریزش رسپتوری نیز نشان داد میزان P-Sel محلول فرآورده‌های فیلتری نسبت به غیر فیلتر در روز سوم به صورت معناداری کمتر بود.

نتیجه گیری

مطالعه‌ها نشان داد با توجه به بیان و ریزش این رسپتور، فیلتراسیون کاهش لکوسیتی می‌تواند منجر به کاهش آسیب‌های دوران نگهداری باشد.

کلمات کلیدی: P-Selestin ، فرآیند کاهش لکوسیتی، فعالیت پلاکتی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۴/ ۳/۱۶

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD هماتولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- متخصص آسیب‌شناسی بالینی و تشریحی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسؤول: دکترای علوم آزمایشگاهی، PhD بیوشیمی بالینی و فلوشیپ پلاکت و هموستاز ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

مقدمه

عملکرد اصلی پلاکت‌ها، شکل‌دهی پلاک هموستاتیک در پاسخ به آسیب عروقی به منظور توقف خونریزی است(۱). فعال شدن پلاکت‌ها و اتصال آن‌ها به مکان‌های آسیب عروقی، یک فرآیند چند مرحله‌ای مشابه چسبندگی نوتروفیل‌ها به اندوتلیوم ملتهب است که به واسطه واکنش رسپتورهای سلکتینی و اینتگرینی با لیگاندهای مربوطه صورت می‌پذیرد(۲).

تزریق فرآورده‌های پلاکتی یکی از مهم‌ترین راه‌کارهای درمانی در مواجهه با بیماران ترومبوسیتوپنیک و هم چنین ممانعت و یا پیشگیری از عوارض خونریزی‌دهنده است. دو روش کلی برای تهیه پلاکت وجود دارد که شامل تهیه پلاکت از خون کامل و پلاکت آفرزیس می‌باشد. انواع فرآورده‌های پلاکتی شامل پلاسمای سرشار از پلاکت Platelet Rich Plasma (PRP)، بافی کوت Buffy coat (BC) و پلاکت حاصل از آفرزیس‌اند که هر کدام از آن‌ها ممکن است همراه با روش‌های کاهش لکوسیت نیز باشند(۳).

آسیب‌های دوران نگهداری پلاکت Platelet Storage Lesion (PSL) به مجموعه‌ای از اختلالات مرتبط با ذخیره‌سازی پلاکت اطلاق می‌شود که ناشی از بیش فعالی ناخواسته پلاکت‌ها در سطوح مختلف است(۴). در شرایط *in vitro* ، کیفیت پلاکت‌های نگهداری شده را می‌توان با مطالعه مورفولوژی، چرخش(swirling)، نحوه پاسخ به آگونیست‌ها، بررسی بیان گلیکوپروتئین‌های سطحی(GPIb، GPIIb/GPIIIa) و بررسی مارکرهای فعال شدن پلاکت شامل CD40L ، P-Sel و CD63 مورد مطالعه قرار داد(۵).

مطالعه‌ها حاکی از یک ارتباط معکوس قوی بین بیان سطحی P-Sel و بازیابی فعالیت(recovery) در پلاکت‌های تزریقی می‌باشد(۶). بنابراین در میان شاخص‌های مورد مطالعه در PSL ، بررسی میزان تغییرات P-Sel از اهمیت به سزایی برخوردار است که ناشی از افزایش برگشت ناپذیر سطوح کلسیم داخل سلولی و آزادسازی محتویات گرانولی آلفا می‌باشد(۲). نقش P-Sel پلاکتی در جذب لکوسیت‌ها به ترومبوس در حال رشد بسیار حایز اهمیت است(۷).

هم‌زمان با توسعه تشکیل ترومبوس در *in vivo* به دلیل افزایش سطوح کلسیم داخل سلولی و متعاقباً فعالیت متالوپروتئینازهای غشایی، فرآیند ریزش(Shedding) رسپتورهای پیش التهابی نیز رخ می‌دهد که اهمیت به سزایی در تنظیم مراحل جذب و فراخوانی گلبول‌های سفید در محل لخته و در نتیجه تنظیم فرآیندهای التهابی دارد. با این وجود به رغم نقش فیزیولوژیکی رسپتورهای پیش التهابی، بیان این رسپتورها در فرآورده‌های پلاکتی نگهداری شده منجر به اختلالات عملکردی این عناصر در مواجهات سلولی متعاقب تزریق خواهد بود(۶، ۴).

P-Sel محلول در فرآورده‌های پلاکتی نیز وجود دارد و این احتمال که افزایش آن بتواند به عنوان یک فاکتور خطر برای ترومبو آمبولیسم وریدی مطرح باشد، مد نظر محققین قرار گرفته است(۸).

بررسی‌های مختلف، ارتباط مستقیمی بین شکل محلول P-Sel و درصد پلاکت‌های P-Sel مثبت را گزارش می‌نماید و مطالعه‌های موجود حاکی از افزایش آن‌ها در فرآورده‌های پلاکتی متناسب با زمان نگهداری است(۱۰-۸). صرف نظر از افزایش بیان و یا ریزش رسپتور P-Sel در فرآورده‌ها، موضوع قابل توجه دیگر در این مطالعه، نقش واکنش‌های متقابل پلاکت- لکوسیتی، در القای فرآیندهای مرتبط با فعال‌سازی پلاکت‌ها می‌باشد. در این رابطه برخی از مطالعه‌های انجام شده حاکی از اثرات مضاعف تحریکی لکوسیت‌ها بر روی پلاکت‌های فعال شده است که این اثرات می‌تواند متاثر از واکنش محصولات گرانولی لکوسیت‌های تحریک شده با پلاکت‌های فعال در یک فرآیند متقابل باشد(۱۲، ۱۱، ۷).

با توجه به این بررسی‌ها، احتمال این که حذف و یا کاهش لکوسیت‌ها در فرآورده‌های پلاکتی بتواند منجر به تاثیراتی در کاهش فرآیند PSL گردد، مد نظر خواهد بود. لذا در این مطالعه، از بررسی سطوح بیان و هم چنین ریزش رسپتور پیش التهابی P-Sel به عنوان یکی از شاخص‌های افزایش فعالیت پلاکتی در حین نگهداری و هم چنین شاخصی مفید جهت ارزیابی غیر مستقیم عملکرد فرآورده‌های عادی و فرآورده‌های کاهش لکوسیتی پلاکت در بالین استفاده خواهد شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی ـ کاربردی بود. جامعه مورد مطالعه کیسه‌های پلاکتی متراکم و کیسه‌های خون کامل تهیه شده در پایگاه انتقال خون تهران بودند. نمونه‌گیری به صورت انتخاب تصادفی انجام پذیرفت. ۵ کیسه پلاکتی متراکم به صورت عادی و ۵ کیسه پلاکتی به صورت فیلتر شده مورد بررسی قرار گرفتند. از ۵ کیسه خون کامل نیز نمونه کنترل پلاکتی با استانداردهای آزمایشگاهی جداسازی گردید. در این روش برای تهیه پلاکت کنترل مرجع، ابتدا کیسه خون در دور سبک ۳۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و پلاسمای سرشار از پلاکت(PRP) از رسوب RBC جدا گردید. سپس در مرحله بعد در دور ۱۷۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گشت و پلاسمای رویی برداشته و تکمه پلاکتی در محلول تایرود حاوی ۱ میلی‌مولار کلرید کلسیم و ۰/۰۲ U/mL Aprase سوسپانسیون مجدد گردید. در خصوص پلاکت کنسانتره تنها مرحله دوم سانتریفیگاسیون انجام پذیرفت و جداسازی پلاکت مطابق دستورالعمل ادامه یافت.

فیلتراسیون کیسه‌های پلاکتی با استفاده از فیلترهای in line پلاکتی محصول شرکت PALL (Pall medical ref number PL1BE-America) صورت پذیرفت. برای این منظور ابتدا ورودی کیسه پلاکتی زیر هود باز و به فیلتر متصل گردید؛ لکوسیت‌های موجود در کیسه پلاکتی ضمن عبور از فیلتر، توسط فیلتر برداشته شدند و نمونه پلاکتی فاقد لکوسیت در کیسه متصل به فیلتر جمع‌آوری شد. با استفاده از دستگاه متصل‌کننده کوردهای کیسه‌های خون به شکل استریل(Terumo Sterile Tubing Welder TSCD-II- ژاپن -Terumo Corporation)، کیسه‌های پلاکتی عادی و فیلتر شده در شرایط بسته و استریل در کیسه‌های اقماری(آمریکا ـ JMS-North) به سه بخش تقریباً مساوی تقسیم شدند که تا زمان آزمایش در آژیتاتور پلاکتی انکوباتوردار و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. نمونه‌های حاصله از این سه بخش در روزهای متوالی ۱، ۳ و ۵ بعد از نگهداری بررسی شدند.

بعد از فیلتراسیون، گلبول‌های سفید با استفاده از چمبر نجت(Nageotte Chamber) شمارش شدند تا از کاهش شمارش لکوسیتی به زیر حد مجاز، یعنی $۸/۳ \times ۱۰^{۵}$ در هر کیسه پلاکتی، اطمینان حاصل شود(۱۳).

آگونیست قوی یونوفور کلسیم A23187 (سیگما، آلدریچ، آمریکا) منجر به افزایش شدید کلسیم داخل سلولی پلاکت و فعال‌سازی پلاکت‌ها در حد بسیار بالایی می‌شود و در این شرایط بالاترین سطح ریزش مارکرهای پلاکتی و به خصوص P-Sel را خواهیم داشت. به لوله‌های پلاکتی، یونوفور کلسیم A23187 در غلظت نهایی ۵ میکرومولار افزوده و بعد از طی ۲ ساعت، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، این لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۷۰۰ g سانتریفوژ و پلاسمای آن جدا گردید که بعد از جداسازی میکروپارتیکل‌ها، از این پلاسما به عنوان کنترل مثبت آزمایش الایزا برای بررسی حداکثر Shedding استفاده شد.

جهت مطالعه‌های پاسخ پلاکت به تحریکات آگونیستی، میزان لازم از آگونیست TRAP (سیگما، آلدریچ، آمریکا) در غلظت نهایی ۲ میکرومولار اضافه شد. این آگونیست جهت ایجاد پلاکت‌های تحریک شده، برای مطالعه پاسخ به آگونیست استفاده گردید.

برای بررسی بیان P-Sel از دستگاه فلوسایتومتر(پارتک ـ آلمان) و جهت آنالیز یافته‌ها از نرم‌افزار flowjo استفاده گردید.

ابتدا پلاکت‌ها را با محلول Tyrode به کانت ۵×۱۰^{۸} در میکرولیتر رساندیم، سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۷۰۰ g سانتریفوژ نمودیم تا پلاسمای آن جدا گردید. تکمه پلاکتی را با Tyrode حاوی Apyrase (محصول سیگما) با غلظت نهایی ۰/۰۲ U/mL و کلرید کلسیم ۱ میلی‌مولار سوسپانسیون مجدد کردیم و از آن برای فلوسایتومتری، سوسپانسیونی با کانت ۳×۱۰^{۷} در میکرولیتر تهیه نمودیم. پلاکت‌ها به لوله‌های اپندورف انتقال یافته و در صورت نیاز در مواجهه با آگونیست‌های TRAP (در غلظت نهایی ۲ میکرومولار) و یونوفور کلسیم A23187 (در غلظت نهایی ۵ میکرومولار) تیمار گردیدند و یا بدون آگونیست همراه با آنتی‌بادی ضد CD62P (mouse anti human CD62 P-PE-BD)(بیوساینس ـ نیوجرسی) و یا آنتی‌بادی علیه CD42b (anti human CD42b-FITC- eکالیفرنیا

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

bioscience-) بـه مـدت ۴۵ دقیقـه در دمـای ۳۷ درجـه سانتی‌گراد انکوبه شدند. شایان ذکر است که لوله‌ای نیز بـه عنوان کنترل ایزوتایپ با اضافه نمودن IgG1 موشی(Mouse IgG1 Isotype control ـ میلتنی بیوتـک ـ آلمـان)، بـدون آنتی‌بادی‌های اختصاصی در نظر گرفتـه شـد. بعـد از طـی شدن زمـان انکوباسـیون، پلاکـت‌هـا بـا پارافرمالدهیـد ۲٪ فـیکس گردیـده و متعاقبـاً جهـت تجزیـه و تحلیـل فلوسایتومتری به لوله‌های مخصـوص منتقـل گردیدنـد. در فلوسایتومتری ابتدا جمعیـت پلاکتـی توسـط پلاکـت‌هـای رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی علیه CD42b مشخص گردیـد. به منظور اطمینان از عملکردی بودن پلاکت‌ها، نمونـه‌هـای پلاکتی روز اول که با آگونیست TRAP تیمار گردیده بـود، در مقابل پلاکت در حال استراحت از نظر بیان P-Sel مـورد ارزیابی قرار گرفت.

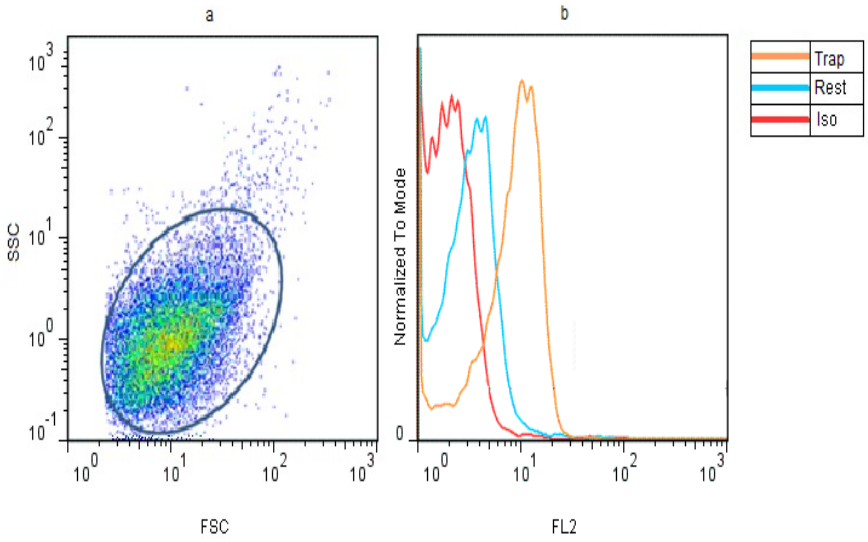
برای بررسی Shedding مولکول P-Sel ، پلاسمای جـدا شده اولتراسانتریفوژ گردید. به این صورت که ابتدا پلاسـما در دور g ۲۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و سپس بـه مـدت ۱۰ دقیقه دیگر، سانتریفوژ گشت تا میکروپارتیکل‌های احتمالی موجود، از پلاسما حذف شوند. برای سنجش کمی مولکول P-Sel محلـول، کیـت انـدازه‌گیـری از شـرکت آبکـام(P-Selectin human ELISA Kit- abcam) انگلسـتان بـا روش ساندویچ مورد استفاده قرار گرفت.

برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری Graphpad استفاده شد. برای مقادیر خام هر گروه، میـانگین و انحـراف معیـار محاسبه شد و برای مشخص کردن منشـا تفـاوت احتمـالی بـین سـه گـروه، از آزمـایش Anova-one way (بـا پسـت آزمایش Newman- Keuls Multiple Comparison) اسـتفاده شد. بـرای مقایسـه تفـاوت‌هـای بـین دو گـروه از Mann-Whitney U test استفاده شد.

یافته‌ها

در آنالیز فلوسایتومتری متعاقب بررسی پلاکتی روز اول، گیت پلاکتی مشخص شد و سطوح بیـان P-Sel پلاکـت‌هـا در حالت استراحت و متعاقب آگونیست TRAP نشـان داده شد (شکل ۱).

در فرآورده‌های پلاکتـی عـادی، سـطوح بیـان P-Sel در روزهای ۱ ، ۳ و ۵ به ترتیب ۱/۷ ± ۷/۴ ، ۲ ± ۲۱ و ۲/۲ ± ۱۰ درصد برحسب mean ± SE بود. همان طور کـه اعـداد نشان می‌دهد، بیان این مارکر در روز سـوم نسـبت بـه روز اول افزایش معناداری داشت(p< ۰/۰۵). هم چنـین سـطوح بیان P-Sel در روز پنجم نسبت به روز سوم کـاهش نشـان داد که این کاهش از نظر آماری معنادار بود(p< ۰/۰۵). بیان P-Sel در روز ۵ نسبت به روز ۱ افزایش نشان داد که البتـه از نظر آماری معنادار نبود.

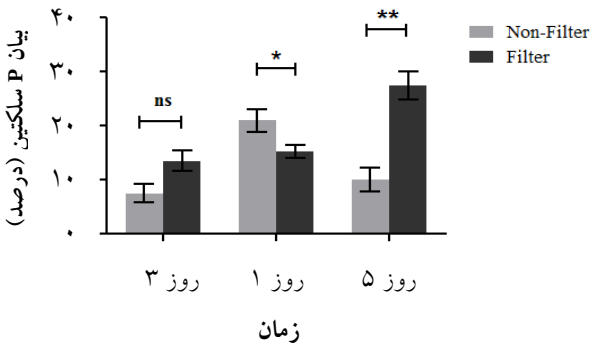


شکل ۱: a- اسکترگرام دو بعدی(SSC/FSC) و گیت پلاکتی مربوطه را نشان می‌دهد. b- هیستوگرام، بیان P-Sel پلاکت در حال استراحت و فعال شده متعاقب آگونیست TRAP را نشان می‌دهد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

در فرآورده‌های فیلتر شده، سطوح بیان P-Sel در روزهای ۱ و ۳ و ۵ به ترتیب ۱/۸ ± ۱۳/۵ ، ۱/۲ ± ۱۵/۲ و ۲/۵ ± ۲۷/۴ درصد بر حسب mean ± SE بود. P-Sel در روز سوم نگهداری نسبت به روز اول افزایش نشان داد که البته از نظر آماری معنادار نبود. سطوح بیان P-Sel در روز پنجم نسبت به روز سوم افزایش نشان داد که این افزایش از نظر آماری معنادار بود(p< ۰/۰۵). بیان P-Sel در روز ۵ نسبت به روز ۱ افزایش نشان داد که از نظر آماری معنادار بود(p< ۰/۰۵).

میزان بیان P-Sel نمونه پلاکت کنترل در روز تهیه، ۱٪ ± ۹٪ بر حسب mean ± SE بود. میزان بیان رسپتور P-Sel در نمونه‌های غیر فیلتر تفاوت معناداری با نمونه کنترل تهیه شده در آزمایشگاه نداشت در حالی که میزان P-Sel فرآورده‌های فیلتر نسبت به کنترل افزایش معنادار نشان داد(p< ۰/۰۵).



نمودار ۱: تغییرات بیان P-Sel فرآورده‌های فیلتر و غیر فیلتر در طی نگهداری

* (p< ۰/۰۵).

** (p< ۰/۰۱).

ns (no significant). data are mean ± SE (standard error)

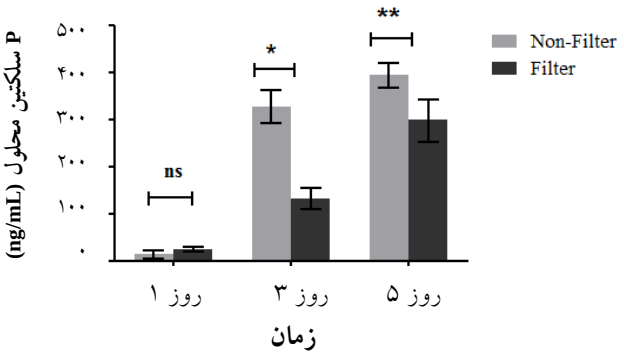
در مقایسه فرآورده‌های فیلتر و غیر فیلتر مشاهده شد که بیان P-Sel در فرآورده‌های فیلتر شده در طی دوران نگهداری به صورت صعودی افزایش نشان داد؛ در حالی که در فرآورده‌های غیر فیلتر، افزایش بیان P-Sel در روز سوم با کاهش این مارکر در روز پنجم همراه بود. همان طور که پیشتر ذکر شد، در روز اول نگهداری تفاوت این مارکر بین این دو فرآورده از نظر آماری معنادار نبود اما در روز سوم و پنجم این تفاوت از نظر آماری معنادار بود که در روز سوم بیان این مارکر در فرآورده‌های غیر فیلتری نسبت به فیلتری بالاتر(p< ۰/۰۵) و در روز پنجم در فرآورده‌های فیلتری نسبت به غیر فیلتری بالاتر بود(p< ۰/۰۱)(نمودار ۱).

در آنالیز الایزا مشاهده شد که در فرآورده‌های غیر فیلتر، سطوح P-Sel محلول در روزهای ۱ و ۳ و ۵ به ترتیب ۶ ± ۱۴ ، ۳۵ ± ۳۲۹ و ۲۷ ± ۳۹۵ ng/mL بر حسب mean ± SE بود. سطوح P-Sel محلول در طی نگهداری افزایش یافت. میزان این مولکول در روز اول نسبت به کنترل تفاوت معناداری نشان نداد. افزایش این مولکول در روز سوم نسبت به روز اول معنادار بود(p< ۰/۰۰۱)، اما افزایش در روز پنجم نسبت به روز سوم از نظر آماری معنادار نبود. P-Sel محلول در روز ۵ نسبت به روز ۱ افزایش نشان داد که این افزایش از نظر آماری معنادار بود(p< ۰/۰۰۱).

در فرآورده‌های فیلتری، سطوح P-sel محلول در روزهای ۱ و ۳ و ۵ به ترتیب ۵ ± ۲۵ ، ۲۳ ± ۱۳۳ و ۴۵ ± ۲۹۹ ng/mL بر حسب mean ± SE بود که مانند پلاکت‌های غیر فیلتر، الگوی افزایشی نشان داد. در این فرآورده‌ها نیز سطوح این مولکول در روز تهیه نسبت به کنترل تفاوت معناداری نشان نداد. در روز سوم نگهداری میزان این مولکول نسبت به روز اول افزایش معناداری داشت(p< ۰/۰۵). میزان P-Sel محلول در روز پنجم نسبت به روز سوم افزایش معنادار نشان نداد. میزان P-Sel محلول در روز پنجم نسبت به روز اول افزایش نشان داد که این افزایش از نظر آماری معنادار بود(p< ۰/۰۰۱). در مقایسه‌ای که بین فرآورده‌های فیلتر شده و غیر فیلتر صورت گرفت، در روز ۱ نگهداری، اگر چه میزان این مولکول در پلاکت‌های فیلتر شده اندکی بالاتر از پلاکت‌های فیلتر نشده بود، اما از نظر آماری معنادار نبود. در روز سوم نگهداری، میزان P-Sel محلول در پلاکت‌های فیلتر نشده نسبت به فیلتر شده افزایش نشان داد که از نظر آماری معنادار بود(p< ۰/۰۵). در روز پنجم نگهداری، اگر چه میزان P-Sel محلول در پلاکت‌های فیلتر نشده نسبت به فیلتر شده بالاتر بود ، اما این تفاوت از نظر آماری معنادار

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

نبود(نمودار ۲).



نمودار ۲: تغییرات میزان P-Sel محلول فرآورده‌های فیلتر و غیر فیلتر در طی نگهداری

(no significant) ns

(p< ۰/۰۵) *

data are Mean ± SE (standard error)

بحث

همان گونه که قبلاً ذکر شده است، امروزه مراکز انتقال خون دنیا فرآورده‌های پلاکتی را با روش‌های مختلفی تولید می‌کنند که تاکنون مطالعه‌های متعددی در خصوص مقایسه کیفیت این فرآورده‌ها با استفاده از روش‌های مرسوم صورت گرفته است. دسته‌ای از پژوهش‌ها به بررسی و مقایسه فرآورده‌های پلاکتی مشتق از بافی‌کوت buffy coat (BC) و پلاسمای سرشار از پلاکت PLT-rich plasma (PRP) و هم چنین پلاکت‌های تهیه شده با روش آفرزیس پرداخته‌اند. از جمله این مطالعه‌ها، بررسی اسکریپ چنکو است که نتایج حاصله در تایید مطالعه‌های قبلی بوده است و حاکی از فعال شدن بیشتر پلاکت‌های حاصل از روش PRP در حین تولید در مقایسه با روش BC است. در محصولات آفرزیس نیز P-Sel به عنوان مارکر فعال شدن پلاکت در سطح پلاکت و در پلاسما سنجیده شد که بیانگر افزایش تدریجی آن در طول نگهداری بود(۸). در مطالعه‌ای که روی محصولات PRP وBC انجام شد، محققان دریافتند که درصد بالاتری از پلاکت‌های P-Sel مثبت در محصولات تهیه شده با روش PRP نسبت به محصولات تهیه شده با روش BC وجود داشت(۹).

در بررسی مشابهی که توسط لوین و همکارانش انجام پذیرفته نیز مطالعه متغیرهایی چون pH ، PO_2 ، PCO_2 ، گلوکز و لاکتات به همراه P-Sel و CD42a حاکی از شاخص‌های پایین‌تر فعالیت پلاکتی در فرآوردهای تولیدی با روش BC نسبت به PRP بوده است(۱۴). در مطالعه‌ای دیگر هولمز و همکارانش نشان دادند که متعاقب تهیه پلاکت‌های خون کامل و PRP ، بیان اندک P-Sel در حدود ۱۰٪-۲٪ در روز اول دیده می‌شود؛ در حالی که بیان افزایشی P-Sel در حدود ۳۰٪-۲۰٪ در پلاکت‌های کنسانتره روز اول دیده می‌شود(۱۵).

رایندر و همکارانش نشان دادند که بین ۶۰٪-۴۰٪ از پلاکت‌ها در طول نگهداری P-Sel را بیان می‌کنند و درصد پلاکت‌های P-Sel مثبت در طول نگهداری PRP ، به طور فزاینده‌ای افزایش می‌یابد(۱۷، ۱۶). در یک بررسی که توسط میدل برگ و همکارانش انجام شد، بیان P-Sel در هر روز حدود ۱/۲٪ افزایش داشت(۱۸).

در رابطه با پلاکت‌های غیر فیلتر در مطالعه حاضر، نشان داده شده است که درصد بیان P-Sel در روز اول، تفاوت معناداری با کنترل در حال استراحت نشان نداد. اما در روز سوم نگهداری نسبت به روز اول افزایش معناداری مشاهده شد که بیانگر اوج گرفتن فرآیند PSL بود. بیان این مارکر در روز پنجم با کاهش چشمگیری همراه بود که با توجه به بالا بودن بیان این مارکر در روز سوم، احتمال می‌رود که این کاهش ناشی از میکروپارتیکولاسیون و یا ترشح شدید P-Sel در مراحل نهایی فعال شدن پلاکت‌ها باشد. چرا که میکروپارتیکولاسیون پلاکتی باعث از دست رفتن عمده سطح غشایی پلاکت همراه با رسپتورهای سطحی موجود آن می‌شود. با این وجود یافته ما متفاوت از یافته‌های براون، رایندر و میدل برگ می‌باشد که افزایش مداوم درصد P-Sel را در طول دوران نگهداری نشان داده‌اند(۱۸-۱۶). این امر نیز می‌تواند به دلیل فعالیت بالاتر پلاکتی در روز پنجم نگهداری فرآوردهای ما باشد که منتج به ترشح بالاتر رسپتور و یا میکروپارتیکولاسیون شدیدتر پلاکتی گردیده است. به نظر می‌رسد بررسی هم زمان بیان PSel و آزادسازی میکروپارتیکل‌ها در مطالعه‌های آینده در تفسیر دلایل این کاهش راهگشا باشد(مطالعه منتشر نشده دکتر قاسم‌زاده و همکاران). اثرات روش‌های کاهش

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

لکوسیتی در مقوله PSL تاکنون موضوعی بحث برانگیز(controversial) بوده است که طیفی از گزارش‌های متناقض را شامل می‌گردد. گزارش‌های معدودی وجود دارد که حاکی از نقش کاهنده فرآیند حذف لکوسیتی بر روی PSL و فعال شدن پلاکت‌ها می‌باشد. در یکی از این پژوهش‌ها، محققین نشان داده‌اند که فیلتراسیون قبل از ذخیره می‌تواند سرعت فعال شدن پلاکت‌ها را در مدت نگهداری کاهش دهد که این امر ناشی از حذف میزان قابل قبولی از گلبول‌های سفید است(۱۹). در مطالعه دیگری که بر روی فرآورده‌های پلاکتی کاهش لکوسیتی پیش از ذخیره انجام شد، مشخص شد که فیلتراسیون کاهش لکوسیتی باعث کاهش بیان P-Sel و کاهش فرم محلول HLA-1 (sHLA-1) می‌گردد(۲۰).

این مطالعه‌ها در تناقض با یافته‌های برخی دیگر از محققین قرار دارد که معتقدند فیلتراسیون اثر منفی روی فعالیت پلاکت‌ها دارد به طوری که تماس فیزیکی بین فیلتر و پلاکت‌ها سبب فعال شدن پلاکت‌ها شده و در نهایت حیات و عملکرد آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نمونه‌ای از این مطالعه‌ها توسط فوکوناگا و همکارانش انجام پذیرفته که نشان داده‌اند بیان آنتی‌ژن‌های P-Sel و CD63 (که به عنوان مارکرهای فعال شدن پلاکت شناخته می‌شوند)، در استفاده از فیلتر افزایش می‌یابد(۲۱). در این رابطه، مطالعه برادلی و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان داده است که فیلتراسیون پیش از ذخیره می‌تواند روند فعال شدن پلاکت‌ها در طی مدت ذخیره‌سازی را تسریع نماید. این گروه نشان دادند که پلاکت‌های فیلتر شده به طور قابل توجهی سطوح بالاتری از مارکرهای فعال شدن پلاکتی شامل P-Sel و CD63 ، تغییرات مورفولوژی و افزایش میکروپارتیکل را در طول زمان نگهداری نشان می‌دهند(۲۲). در مطالعه کاستلی و همکارانش نیز نشان داده شد در طی ۸ روز نگهداری فرآورده‌های PRP فیلتر شده، افزایش ثابتی در درصد سلول‌های P-Sel مثبت دیده شد(۹).

مضاف بر این پاره‌ای از مطالعه‌ها نیز وجود دارند که حاکی از تاثیرات نامحسوس و یا اندک فیلترهای کاهش لکوسیتی بر روی ارتقای عملکرد پلاکت‌ها در فرآورده‌های تولیدی می‌باشند که از جمله آن‌ها مطالعه‌ای از دزیک و همکارانش و سوئنی و همکارانش در خصوص اثر لکوسیت‌های باقی‌مانده بر فرآیند PSL می‌باشد(۲۴، ۲۳).

فارغ از هرگونه مقایسه بین فرآورده‌های فیلتر شده و فیلتر نشده، در فرآورده‌های فیلتر شده کاهش لکوسیتی نیز همانند فرآورده‌های غیر فیلتر، افزایش فرآیند PSL رابطه مستقیمی با طول دوره نگهداری دارد و درصد بیان P-Sel در طول نگهداری افزایش می‌یابد که همراه با کاهش بقا می‌باشد(۲۵).

مطالعه‌های ما درخصوص فرآورده‌های فیلتر شده حاکی از آن است که میزان بیان P-Sel پلاکت‌ها در روز اول نگهداری، به شکل معناداری بالاتر از میزان یاد شده در نمونه کنترلی استاندارد بوده است. به نظر می‌رسد این افزایش بیان می‌تواند به علت تحریک پلاکت‌ها حین برخورد با فیلتر باشد. در پلاکت‌های فیلتر شده بیان P-Sel در روز سوم نگهداری افزایش یافت که البته معنادار نبود. به نظر می‌رسد دلیل عدم تفاوت معنادار افزایش P-Sel در روز سوم نسبت به روز اول که برخلاف نمونه غیر فیلتر بوده است، افزایش بیان ناخواسته موجود در روز اول نمونه فیلتر شده باشد که موجب کاهش این تفاوت گردیده است. در روز پنجم، بیان P-Sel نسبت به روز سوم و اول با افزایش همراه بود که با اهمیت تلقی می‌شد.

در این پژوهش، بیان P-Sel در پلاکت‌های فیلتر و غیر فیلتر مقایسه گردید که با توجه به مجموع نتایج، تاثیر مثبت فیلتراسیون کاهش لکوسیتی را نشان داد که احتمالاً ناشی از حذف لکوسیت‌ها می‌باشد(نمودار ۱). همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، در روز پنجم، افزایش بیان P-Sel در کیسه‌های فیلتر شده به سیر صعودی خود ادامه داد که به طور غیر مستقیم نشان دهنده این است که پلاکت‌ها ممکن است دچار میکروپارتیکولاسیون و ریزش کمتر این مارکر در مقایسه با فرآورده فیلتر نشده‌ای گردیده باشند که در روز پنج نگهداری خود، بیان P-Sel آن‌ها با کاهش چشمگیری نسبت به روز سوم نگهداری همراه بود. این امر حاکی از این است که در فرآورده‌های فیلتر شده میزان فعالیت پلاکتی کمتر بوده است که در نتیجه آن چه به دلیل محتمل کمتر بودن Shedding اختصاصی رسپتور و یا چه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

به دلیل میکروپارتیکولاسیون کمتر و از دست رفتن کمتر غشای حامل رسپتور از سطح پلاکت، میزان بیان PSel در فرآورده فیلتره روز پنجم کاهش نیافته است.

در خصوص سطح P-Sel محلول در فرآورده‌های پلاکتی نگهداری شده نیز مطالعه‌های متعددی توسط سایر محققان انجام شده است که مطالعه‌های ما نیز هم‌خوانی متناسبی را با تحقیقات نشان داده است. در تحقیقات ما با توجه به اولتراسانتریفوژ صورت گرفته در پلاسما، سطوح حاصله منعکس کننده میزان P-Sel ترشحی است و برخلاف اکثر مطالعه‌ها P-Sel موجود، میکروپارتیکل‌ها را شامل نمی‌شود. کاستلی و همکارانش اذعان داشتند که آنالیز ایمنواسی P-Sel محلول نسبت به فلوسایتومتری برای سنجش درصد سلول‌های P-Sel مثبت حساس‌تر است و منجر به شناسایی سریع‌تر فعال شدن پلاکت‌ها می‌شود. این مطالعه هم چنین حاکی از آن است که میزان P-Sel محلول در فرآورده‌های پلاکتی PRP به شکل معناداری نسبت به بافی کوت بالاتر است($p< ۰/۰۵$). این گروه هم چنین نشان داد که در طول ۸ روز نگهداری فرآورده‌های پلاکتی PRP فیلتر شده، افزایش پایداری در P-Sel محلول دیده می‌شود که به علاوه به طور معناداری مرتبط با درصد سلول‌های P-Sel مثبت بود($p< ۰/۰۰۰۱$)(۹).

در مطالعه ما نیز که روی پلاسمای اولتراسانتریفوژ شده حاصل از پلاکت‌های غیر فیلتر و فیلتر صورت گرفت، میزان P-Sel محلول فرآورده‌های پلاکتی نسبت مستقیمی با طول زمان نگهداری داشته است که این افزایش منعکس کننده میزان P-Sel ترشحی(shed شده) می‌باشد. میزان افزایش P-Sel محلول در روز سوم و پنجم نسبت به روز اول معنادار بود. افزایش shedding این مارکر در حین نگهداری می‌تواند وقوع PSL را پیش‌بینی کند. نتایج با پلاکت‌های کنترل مقایسه و تایید شد. به طور کلی میزان P-Sel محلول فرآورده‌های فیلتره نسبت به غیر فیلتره پایین‌تر است که نشان‌دهنده کیفیت بالاتر فرآورده‌های فیلتره می‌باشد. این کاهش به خصوص در روز سوم نگهداری در فرآورده‌های فیلتره به صورت معناداری پایین‌تر است.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های این پژوهش نشان داد که فرآیند فیلتراسیون کاهش لکوسیتی هر چند در روز اول نگهداری ممکن است به دلایلی منجر به افزایش اندک میزان بیان و سطح محلول P-Sel گردد، ولیکن به طور کلی کاهش لکوسیت‌ها می‌تواند اثر مثبتی در کاهش میزان P-Sel در طول دوره نگهداری فرآورده پلاکتی داشته باشد. این موضوع با توجه به سنجش بیان سطحی این مارکر و فرم محلول آن قابل استنباط است، زیرا همان طور که گفته شد، کاهش بیان سطحی P-Sel فرآورده‌های غیر فیلتر در روز پنجم می‌تواند ناشی از ریزش این مارکر به دلیل فعالیت شدیدتر پلاکتی باشد موضوعی که در فرآورده‌های فیلتر شده مشاهده نگردید. این یافته در راستای مطالعه‌های علوم پایه‌ای است که نشان داده‌اند، لکوسیت‌ها می‌توانند نقشی اساسی را در فعال‌سازی پلاکت ایفا نمایند، با این وجود مطالعه سایر مارکرهای فعالیتی پلاکت‌ها می‌تواند جهت تایید یافته‌های موجود مغتنم باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۴۹۶-۳۳-۰۱-۱۳۹۰ دکتر مهران قاسم‌زاده می‌باشد که بخشی از آن پایان‌نامه خانم مهدیه مهرپوری دانشجوی کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون است. نویسندگان از حمایت‌های مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون تشکر می‌نمایند، هم چنین همکاری مجدانه پایگاه انتقال خون استان تهران به خصوص خانم فاطمه عباسی نیز شایان تقدیر است. نویسندگان هم‌چنین از زحمات خانم مهندس مریم‌السادات طاهری تشکر می‌نمایند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

References :

1- Hosseini E, Ghasemzadeh M. Different stages of platelet adhesion to the site of vascular injury. IJBC 2012; 4(3): 133-42.
2- Ghasemzadeh M., Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocyte to sites of vascular injury. Thromb Haemost 2015; 113(6): 1224-35.
3- Devine DV, Serrano K. Preparation of blood products for transfusion: is there a best method? Biologicals 2012; 40(3): 187-90.
4- Cauwenberghs S, van Pampus E, Curvers J, Akkerman JW, Heemskerk JW. Hemostatic and signaling functions of transfused platelets. Transfus Med Rev 2007; 21(4): 287-94.
5- Ohto H, Nollet KE. Overview on platelet preservation: Better controls over storage lesion. Transfus Apher Sci 2011; 44(3): 321-5.
6- Leytin V, Allen DJ, Gwozdz A, Garvey B, Freedman J. Role of platelet surface glycoprotein Ibalpha and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. Transfusion 2004; 44(10): 1487-95.
7- Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. Thromb Res 2013; 131(3): 191-7.
8- Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. Transfusion 2008; 48(7): 1469-77.
9- Kostelijk EH, Fijnheer R, Nieuwenhuis HK, Gouwerok CW, de Korte D. Soluble P-selectin as parameter for platelet activation during storage. Thromb Haemost 1996; 76(6): 1086-9.
10- Krailadsiri P, Seghatchian J. Are all leucodepleted platelet concentrates equivalent? Comparison of Cobe LRS Turbo, Haemonetics MCS+ LD, and filtered pooled buffy-coat-derived platelets. Vox Sang 2000; 78(3): 171-5.
11- Perrin J, Lecompte T, Tournier A, Morlon L, Marchand-Arvier M, Vigneron C. *In vitro* effects of human neutrophil cathepsin G on thrombin generation: Both acceleration and decreased potential. Thromb Haemost 2010; 104(3): 514-22.
12- Horn M, Bertling A, Brodde, Müller A, Roth J, Van Aken H, *et al*. Human neutrophil alpha-defensins induce formation of fibrinogen and thrombospondin-1 amyloid-like structures and activate platelets via glycoprotein IIb/IIIa. J Thromb Haemost 2012; 10(4): 647-61.
13- Strobel J, Antos U, Zimmermann R, Eckstein R, Zingsem J. Comparison of a new microscopic system for the measurement of residual leucocytes in apheresis platelets with flow cytometry and manual counting. Vox Sang 2014; 107(3): 233-8.
14- Levin E, Culibrk B, Gyöngyössy-Issa MI, Weiss S, Scammell K, LeFresne W, *et al*. Implementation of buffy coat platelet component production: comparison to platelet-rich plasma platelet production. Transfusion 2008; 48(11): 2331-7.
15- Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD. The expression of P-sel during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of *in vivo* viability. Transfusion 1997; 37(1): 12-7.
16- Rinder HM, Snyder EL. Activation of platelet concentrate during preparation and storage. Blood Cells 1992; 18(3): 445-56; discussion 457-60.
17- Braune S, Walter M, Schulze F, Lendlein A, Jung F. Changes in platelet morphology and function during 24 hours of storage. Clin Hemorheol Microcirc 2014; 58(1): 159-70.
18- Middelburg RA, Roest M, Ham J, Coccoris M, Zwaginga JJ, van der Meer PF. Flow cytometric assessment of agonist-induced P-sel expression as a measure of platelet quality in stored platelet concentrates. Transfusion 2013; 53(8): 1780-7.
19- Solaimani Ferizhandy A, Aghaee Pour M, Pourfatollah AA. The Effect of Prestorage Filtration on Platelet Activation in Platelet Concentrates. Razi Journal of Medical Sciences 2005; 12(45): 97-106. [Article in Farsi]
20- Ahmed A S, Leheta O, Younes S. *In vitro* assessment of platelet storage lesion leukoreduced donor platelet concentrates. Blood Transfus 2010; 8(1): 28-35.
21- Fukunaga K, Shimoyama T, Yamaji K, Yamane S, Sueoka A, Nosé Y. *In vitro* comparison study of CD63 and CD62P expression after contacting leukocyte filters. Artif Organs 1999; 23(1): 108-13.
22- Devin DV, Bradley AJ, Maurer E, Levin E, Chahal S, Serrano K, *et al*. Effects of prestorage white cell reduction on platelet aggregate formation and the activation state of platelets and plasma enzyme systems. Transfusion 1999; 39(7): 724-34.
23- Dzik WH, Cusack WF, Sherburne B, Kickler T. The effect of prestorage white cell reduction on the function and viability of stored platelet concentrates. Transfusion 1992; 32(4): 334-9.
24- Sweeney JD, Holme S, Heaton WA, Nelson E. White cell-reduced platelet concentrates prepared by in-line filtration of platelet-rich plasma. Transfusion 1995; 35(2): 131-6.
25- AuBuchon JP, Taylor H, Holme S, Nelson E. *In vitro* and *in vivo* evaluation of leukoreduced platelets stored for 7 days in CLX containers. Transfusion 2005; 45(8): 1356-61.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(2): 153-162

Original Article

The effect of pre-storage leukoreduction on the levels of expression and shedding of the pro-inflammatory molecule P-Sel in random PRP platelets

Mehrpoori M.[1], Hosseini E.[1], Amini Kafi-Abad S.[1], Ghasemzadeh M.[1]

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

Abstract

Background and Objectives

During storage, functional activity of platelets is affected by platelet storage lesion (PSL). The over-expression of P-Selectin is one of the most important evidence of platelet activation, thereby monitoring P-Sel expression and shedding can be considered as an index for performance in platelet concentrates.

Materials and Methods

Ten PRP-platelet concentrates obtained from Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center were subdivided into two groups of usual platelets and leuko-reduced platelets following pre-storage filtration. Flow-cytometery and ELISA were used to evaluate P-Sel expression and shedding, respectively. Data were analyzed by one way-Anova and Mann-Whitney U tests using Graphpad software.

Results

In filtered products, P-Sel expression on days 1, 3 and 5 after storage were 13.5 ± 1.8%, 15.2 ± 1.2% and 27.4 ± 2.5% , respectively. The results showed a sinificant increase of expression in day 5, compared to that in day 1 and 3. In non-filtered products, P-Sel expression on days 1, 3 and 5 were 7.4 ± 1.7%, 21 ± 2%, and 10 ± 2.2%, respectively. Increased expression in day 3 was followed by a significant decrease in day 5, that might be due to the loss of receptors via shedding and/or microparticulation during platelet post-activation. The levels of soluble P-Sel in filtered products were significantly less than unfiltered products in day 3.

Conclusions

Considering the expression and shedding of P-Sel, this study proposes that the leuko-reduction process favor less PSL effect during the storage of platelet products.

Key words: P-Selectin, Leukocyte Reduction Procedures, Platelet Activation

Received: 16 Feb 2015
Accepted: 6 Jun 2015

Correspondence: Ghasemzadeh M., PhD of Biochemistry. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601501-20 ; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *mehran1476@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-27]