

## ارزیابی سازگاری پلاکتی بین بیماران AML و اهداکنندگان پلاکت به روش فلوسیتومتری

محمد صیادی<sup>۱</sup>، مژگان شایگان<sup>۲</sup>، مهین نیکوگفتار ظریف<sup>۳</sup>، محمد واعظی<sup>۴</sup>، اشرف ملک محمدی<sup>۵</sup>،

محمد حسین احمدی<sup>۱</sup>، سعید محمدی<sup>۶</sup>، مریم زادسر<sup>۷</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

مقاومت پلاکتی ایمنیون از جمله عوارض تزریق مکرر پلاکت می‌باشد. هدف از این مطالعه، انجام کراس‌مچ پلاکتی با استفاده از روش فلوسیتومتری برای ارزیابی نتایج تزریق پلاکت بود.

#### مواد و روش‌ها

تعداد ۱۵ بیمار AML بستری با سابقه تزریق پلاکت (حداقل دو بار) و تعداد ۱۵ فرد ظاهراً سالم بدون سابقه تزریق خون و فرآورده‌های آن (کنترل)، در این مطالعه توصیفی بررسی شدند. برای انجام کراس‌مچ پلاکتی، از روش Gates برای کراس‌مچ پلاکتی با استفاده از فلوسیتومتری، استفاده شد. از افراد سالم ۵ mL خون کامل جمع‌آوری و PRP تهیه شد. سرم بیماران با سوسپانسیون پلاکتی مجاور شده و سپس FITC-anti human IgG اضافه و به روش فلوسیتومتری بررسی گردید. نتایج حاصل از کراس‌مچ با CCI بیماران به کمک آزمون‌های من‌ویتنی و ضریب همبستگی پیرسون مقایسه شدند.

#### یافته‌ها

بین کراس‌مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری و نتایج CCI یک ساعته بیماران (با  $r = -0.731$  و  $p = 0.002$ ) و CCI ۲۴ ساعته بیماران (با  $r = -0.744$  و  $p = 0.002$ )، رابطه منفی معناداری وجود داشت. در بیماران مشکوک به مقاومت پلاکتی ایمنیون که میانگین CCI یک ساعته کمتر از ۷۵۰۰ بود، میانگین درصد کراس‌مچ پلاکتی نسبت به افراد بیمار غیر مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمنیون و افراد کنترل تفاوت معناداری وجود داشت ( $p = 0.001$ ).

#### نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد آزمایش کراس‌مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری، ارتباط نسبتاً قوی با CCI یک ساعته دارد و در ارزیابی مقاومت پلاکتی ایمنیون کارایی مناسبی دارد.

**کلمات کلیدی:** فلوسیتومتری، کراس‌مچ خون، پلاسمای غنی از پلاکت

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۵

- ۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
- ۳- PhD هماتولوژی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- متخصص خون و انکولوژی - مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی - تهران - ایران
- ۵- کارشناس پرستاری - مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی - تهران - ایران
- ۶- PhD هماتولوژی - مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی - تهران - ایران
- ۷- متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

## مقدمه

مقاومت پلاکتی عبارت است از عدم افزایش تعداد پلاکت تا حد مطلوب در صورتی که تزریق پلاکت بیش از دو بار انجام شده است، که با محاسبه CCI (Corrected Count Increment) یک ساعته و ۲۴ ساعته پس از تزریق پلاکت می‌توان به مقاومت پلاکتی پی برد (۱، ۲). در بیماران لوکمیک حاد دارای تومور و آپلاستیک که به علت ترومبوسیتوپنی پلاکت دریافت می‌کنند، احتمال ایجاد مقاومت پلاکتی و افزایش نیافتن تعداد پلاکت وجود دارد که باعث خونریزی شدید شده و به مرگ ناشی از خونریزی منجر می‌شود (۳-۵).

برای ارزیابی پاسخ بیمار به تزریق پلاکت، می‌توان از اندازه‌گیری پارامتر CCI یا افزایش تصحیح شده پلاکت استفاده کرد. CCI، ارزیابی پاسخ بیمار به تزریق کیسه‌های پلاکت را نشان می‌دهد. پارامتر CCI در دو مقطع زمانی پس از تزریق پلاکت یک بار ده دقیقه تا یک ساعت پس از تزریق پلاکت که به عنوان CCI یک ساعته نامیده می‌شود و مرتبه بعدی ۲۴-۱۸ ساعت پس از تزریق پلاکت که به عنوان CCI بیست و چهار ساعته نامیده می‌شود، اندازه‌گیری می‌گردد. برای محاسبه CCI از فرمول زیر استفاده می‌شود:

$$\text{سطح بدن (مترمربع)} \times 10^{11} \times (\text{تعداد پلاکت بیمار قبل از تزریق} - \text{تعداد پلاکت بیمار بعد از تزریق}) \\ \text{CCI} = \frac{10^{11} \times \text{تعداد پلاکت‌های تزریق شده}}{}$$

تشخیص نوع مقاومت پلاکتی بر اساس میزان CCI یک ساعته و ۲۴ ساعته تعیین می‌شود. اگر CCI یک ساعته کمتر از ۷۵۰۰ شود، بیمار مشکوک به مقاومت پلاکتی ایمیون می‌باشد و اگر CCI ۱۸ تا ۲۴ ساعته کمتر از ۴۵۰۰ باشد، بیمار مشکوک به مقاومت پلاکتی غیر ایمیون می‌باشد. از جمله علل غیر ایمیون می‌توان به تب، عفونت، اسپلنومگالی، انعقاد منتشر درون عروقی و مصرف برخی داروها نظیر آموتریپسین اشاره کرد که در مقاومت پلاکتی ایجاد شده به یکی از دلایل فوق، میزان CCI ۲۴-۱۸ ساعته کمتر از ۴۵۰۰ خواهد شد. در مقاومت پلاکتی ایمیون، آلوآنتی‌بادی علیه (Human Leukocyte Antigen) HLA و یا آلوآنتی‌بادی علیه (Human Platelet Antigen) HPA ایجاد

می‌شود. در این موارد CCI یک ساعته کمتر از ۷۵۰۰ می‌گردد (۶).

ایمونیزاسیون اولیه علیه HLA ممکن است به وسیله گلبول‌های سفید موجود در کیسه پلاکتی ایجاد شود که نسبت به ایمونیزاسیون HPA شایع‌تر است (۷). پلاکت‌ها دارای HLA-I در سطح خود می‌باشند (۸، ۷). آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های HLA که در ایجاد مقاومت پلاکتی نقش دارند، آنتی‌بادی‌های HLA-A2، HLA-B12، HLA-BW4 و HLA-BW6 می‌باشند (۹).

تاکنون ۳۳ نوع آنتی‌ژن پلاکتی روی ۶ مجموعه گلیکو پروتئینی مهم در سطح پلاکت شناسایی شده‌اند که در اختلالات آلوایمیون پلاکتی مثل ترومبوسیتوپنی آلوایمیون نوزاد و جنین (Fetal Neonatal Alloimmune = FNAIT)، پورپورای پس از تزریق (Post = PTP)، پورپورا (Transfusion Purpura Platelet Refractoriness) PR نقش دارند. بیشترین تعداد آنتی‌ژن پلاکتی شناسایی شده بر روی GPIIb/IIIa قرار دارند که خود نیز به عنوان یک گیرنده مهم در سطح پلاکت در هموستاز و التهاب می‌باشد. سایر گلیکوپروتئین‌های مهم پلاکتی که آنتی‌ژن‌های پلاکتی بر روی آن‌ها قرار دارند، مجموعه گلیکو پروتئینی Ia/IIa، Ib/V/IX و CD109 می‌باشند (۱۱، ۱۰).

شیوع آنتی‌بادی‌ها بر علیه آنتی‌ژن اختصاصی پلاکت (HPA) از ۲ تا ۱۱ درصد متغیر می‌باشد و نسبت به آنتی‌بادی بر علیه HLA ناشایع‌ترند، هم چنین کمتر روی شاخص CCI تاثیر می‌گذارند (۱۲). گرچه مواردی نیز وجود دارد که گزارش می‌کند آنتی‌بادی علیه HPA با کاهش CCI مرتبط است، در بیماری‌های ITP (Immune Thrombocytopenic Purpura) و PTP، آنتی‌بادی بر علیه HPA-1a شایع‌ترین آنتی‌بادی می‌باشد که باعث ایجاد بیماری می‌شود اما در پدیده مقاومت پلاکتی، آلوآنتی‌بادی بر علیه HPA-5b و HPA-1b شایع‌تر است (۱۳).

در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی دارای آلوآنتی‌بادی، باید پلاکت سازگار با سرم بیمار از نظر HLA و HPA انتخاب شود. برای یافتن پلاکت سازگار از لحاظ HLA نیاز به تعداد زیادی اهداکننده دارد، از طرفی به علت

بررسی گردید. ۶ نمونه خون کامل با گروه خون O (عدم تداخل آنتی‌بادی‌های ضد A و B در نتایج آزمایش) در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و با یکدیگر مخلوط شدند. این لوله با نیروی ۲۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، خون کامل به سه قسمت تبدیل شد. قسمت ته لوله حاوی RBC، قسمت میانی باقی‌کوت و قسمت رویی حاوی پلاسما و پلاکت بود که به آن پلاسمای غنی از پلاکت 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 را با دستگاه سل کانتر شمارش کرده و تعداد کل پلاکت در PRP مورد نظر محاسبه گردید.

از پولد پلاکتی تهیه شده از گروه خون O، یک سوسپانسیون سلولی با غلظت  $4 \times 10^7$  تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را در میکروتیوب ریخته و به آن ۵۰ میکرولیتر از سرم بیماران و کنترل در لوله‌های جداگانه اضافه گردید. این سوسپانسیون به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از طی زمان انکوباسیون، سوسپانسیون ۳ مرتبه با PBS (نیروی ۲۰۰۰ g و زمان ۱۰ دقیقه) شست و شو داده شد. پس از آخرین مرحله شست و شو، رسوب زیرین را به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده و به آن ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی آنتی‌هیومن گلوبولین کونژوگه با FITC اضافه و مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال انکوبه گردید. پس از زمان انکوباسیون، بدون خالی کردن میکروتیوب، شست و شو داده شد و در یک میلی‌لیتر از نرمال سالین سوسپانسیون انجام و برای آنالیز به دستگاه فلوسیتومتری داده شد (۱۸).

نتایج حاصل از کراس مچ پلاکتی با CCI یک ساعته و ۲۴ ساعته بیماران مقایسه گردید. ابتدا برای نرمال بودن توزیع متغیرها، چولگی و کشیدگی آن‌ها بررسی شد. به منظور بررسی طبیعی یا غیر طبیعی بودن توزیع متغیرها، عدد Skewness و Kurtosis به دست آمد که باید بین ۲ تا ۲- باشد. بعد از این مرحله، برای مطمئن شدن از توزیع نرمال، آزمون‌های کولموگروف - اسمیرنوف انجام شد. برای بررسی تفاوت میانگین بین گروه بیمار و کنترل از نظر

پلی مورفیسم زیاد سیستم HLA، تعیین HLA یک کار پر هزینه می‌باشد، لذا این کار در برخی از کشورها از جمله در کشور ما در حال حاضر انجام نمی‌شود (۱۴، ۱۵). آزمایش کراس مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری و یا آگلوتیناسیون به منظور بررسی فقدان آنتی‌بادی، قابل انجام است (۱۶، ۱۷). با توجه به ناکافی بودن مطالعه‌ها در مورد مدیریت بیماران مقاومت پلاکتی در کشور، در این مطالعه سعی گردید ضمن راهاندازی آزمایش کراس مچ پلاکتی، نتایج حاصل از دو گروه بیمار و کنترل با یکدیگر مقایسه گردد. آزمایش کراس مچ پلاکتی با روش فلوسیتومتری بر روی نمونه سرم بیماران و افراد کنترل، با روش Gate and Macpherson انجام شد و نتایج حاصل از آزمایش کراس مچ پلاکتی با CCI به دست آمده با یکدیگر مقایسه شدند.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی بوده که ضمن راهاندازی آزمایش کراس مچ پلاکت به روش فلوسیتومتری، مقایسه آن با CCI انجام گردید. جامعه مورد بررسی شامل ۱۵ بیمار AML بستری در بیمارستان شریعتی، در محدوده سنی ۶۸-۳۷ سال و شامل ۴ فرد مؤنث و ۱۱ فرد مذکر که سابقه تزریق پلاکت (حداقل دو بار) داشتند و تعداد ۱۵ فرد سالم در محدوده سنی ۵۲-۲۴ سال و شامل ۷ فرد مؤنث و ۸ فرد مذکر که سابقه تزریق خون و فرآورده‌های آن را نداشتند (کنترل) بود. در هنگام نمونه‌گیری سؤالاتی شامل عفونت، بزرگی کبد و طحال، مصرف داروهای مؤثر بر مقاومت پلاکتی و انجام پیوند سلول‌های بنیادی مورد پرسش قرار گرفتند. معیار ورود به مطالعه، سابقه حداقل دو بار تزریق پلاکت بود. ۵ mL نمونه خون کامل از بیماران و گروه کنترل دریافت شد. سرم آن‌ها جدا و تا زمان آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ابتدا نمونه‌های خون کامل که از افراد سالم در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شده بود، توسط آنتی‌سرم ABO (LORNE)، گروه‌بندی گردید. از خون افراد با نرمال سالین، سوسپانسیون ۵٪-۳٪ تهیه شد. سپس یک قطره از آنتی‌سرم A و B به آن اضافه کرده و آگلوتیناسیون آن

بررسی بر روی دو نمونه بیمار در نمودار نشان داده شده‌اند (نمودار ۱).

میانگین و انحراف معیار برای بیماران مقایسه و بیماران به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه ۵ نفری مبتلا به مقاومت پلاکتی و یک گروه ۱۰ نفری فاقد مقاومت پلاکتی تشخیص داده شدند (جدول ۲).

بررسی CCI نشان داد که پنج بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمون می‌باشند. میانگین و انحراف معیار CCI یک ساعته در کل بیماران  $1202 \pm 6300$  و میانگین و انحراف معیار CCI ۲۴ ساعته در آنان  $993 \pm 5540$  تعیین شد. از نظر آماری تفاوت معناداری بین میانگین CCI یک ساعته و ۲۴ ساعته در دو گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمون و افراد بیمار غیر مبتلا وجود دارد ( $p < 0/05$ ). یعنی شمارش پلاکتی در گروه مبتلا به مقاومت پلاکتی در مقایسه با گروه بیمار غیر مبتلا به مقاومت کمتر بوده، چون در CCI یک ساعته کمتر از ۷۵۰۰، مقاومت

آزمایش کراس مچ پلاکتی، از آزمون آماری مقایسه میانگین دو گروه مستقل به نام من‌ویتنی U استفاده گردید. برای بررسی ارتباط آزمایش کراس مچ پلاکتی با CCI یک ساعته و ۲۴ ساعته، چون متغیر متقارن و توزیع نرمال دارد و متغیر کمی می‌باشد، از Pearson correlation coefficient استفاده گردید. ارزش معناداری عدد p کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

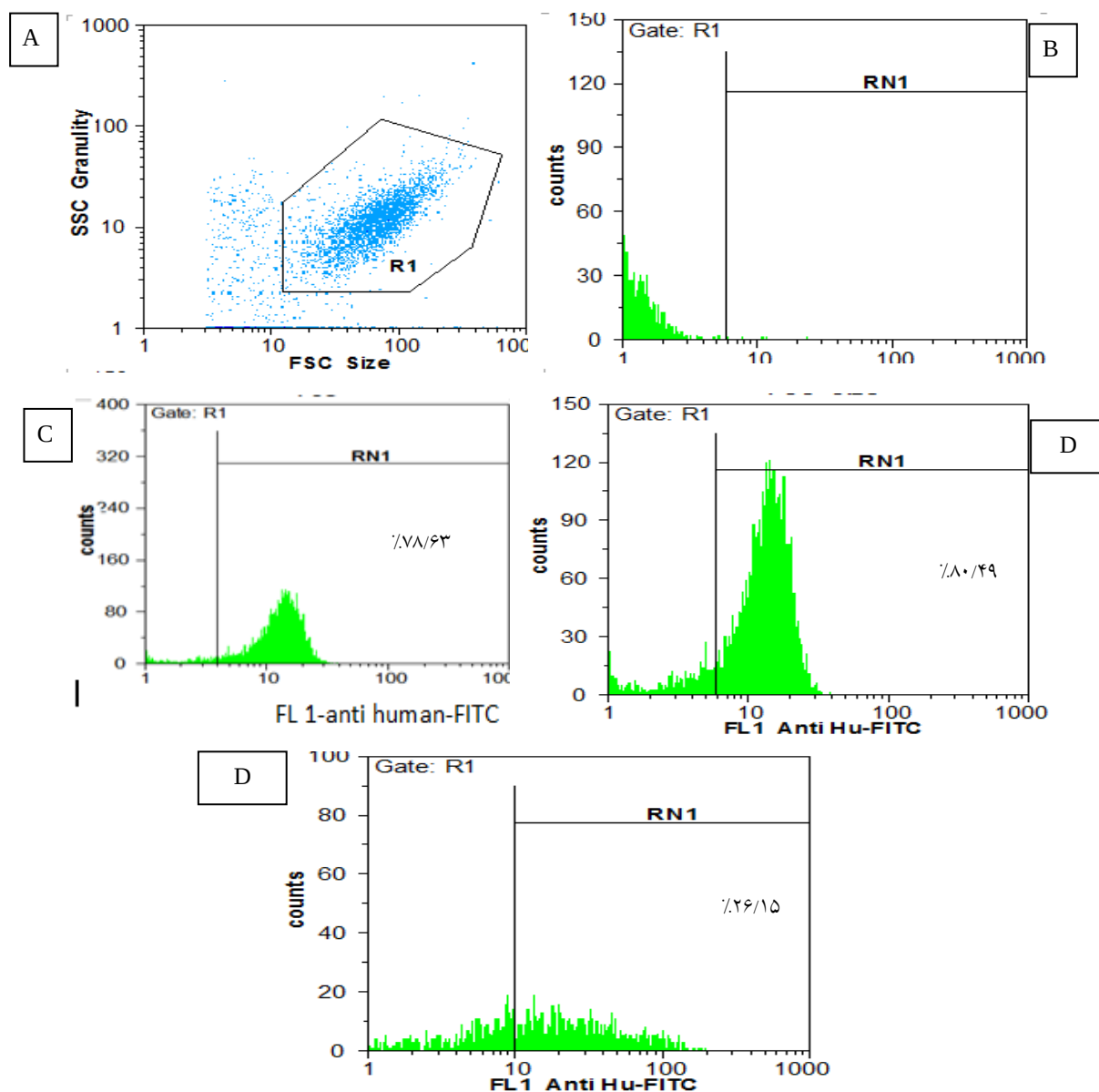
### یافته‌ها

پس از جمع‌آوری اطلاعات بیماران و ثبت نتایج بررسی تعداد پلاکت قبل و بعد از تزریق و تعداد کیسه و نوع پلاکت تزریقی، CCI بیماران محاسبه شد (جدول ۱). در همه بیماران تحت مطالعه، عامل تداخلی (عفونت، مصرف داروی مؤثر بر مقاومت پلاکت و بزرگی کبد و طحال) مشاهده نشد.

بررسی کراس مچ به روش فلوسیتومتری انجام شد نتایج

جدول ۱: نتایج حاصل از محاسبه CCI بیماران طبق فرمول قید شده (۶)

| کد بیمار | نوع فرآورده تزریقی | تعداد کیسه پلاکت تزریقی | CCI 1 hour | CCI 24 hour |
|----------|--------------------|-------------------------|------------|-------------|
| ۱        | رندوم              | ۴                       | ۶۵۰۰       | ۵۸۰۰        |
| ۲        | رندوم              | ۶                       | ۱۰۵۰۰      | ۷۸۰۰        |
| ۳        | رندوم              | ۳                       | ۱۶۳۰۰      | ۱۲۰۰۰       |
| ۴        | رندوم              | ۴                       | ۷۶۰۰       | ۶۸۰۰        |
| ۵        | رندوم              | ۳                       | ۸۰۰۰       | ۷۷۰۰        |
| ۶        | یک بار اهدا        | ۱                       | ۴۲۰۰       | ۳۸۰۰        |
| ۷        | رندوم              | ۳                       | ۱۱۸۰۰      | ۸۶۰۰        |
| ۸        | رندوم              | ۳                       | ۷۲۰۰       | ۶۳۰۰        |
| ۹        | رندوم              | ۴                       | ۱۳۰۰۰      | ۱۰۲۰۰       |
| ۱۰       | رندوم              | ۵                       | ۸۵۰۰       | ۷۱۰۰        |
| ۱۱       | رندوم              | ۴                       | ۷۵۰۰       | ۶۷۰۰        |
| ۱۲       | رندوم              | ۲                       | ۱۲۴۰۰      | ۹۳۰۰        |
| ۱۳       | رندوم              | ۴                       | ۶۹۰۰       | ۵۸۰۰        |
| ۱۴       | رندوم              | ۳                       | ۹۷۰۰       | ۸۵۰۰        |
| ۱۵       | رندوم              | ۵                       | ۶۷۰۰       | ۶۰۰۰        |



نمودار ۱: نمودار نقطه‌ای و بافتی نتایج فلوسیتومتری آزمایش کراس مچ پلاکتی در پلاکت‌هایی که با آنتی‌هیومن گلوبولین واکنش داده‌اند را نشان می‌دهد. (A) گیت جمعیت پلاکتی، (B) کنترل ایزوتیپ FITC، (C) میزان واکنش آنتی‌هیومن کونژوگ با FITC در سلول‌های پلاکت نمونه کنترل مثبت و (D) میزان واکنش آنتی‌هیومن کونژوگ با FITC در سلول‌های پلاکت در دو نمونه مختلف.

پلاکتی ایمیون مطرح می‌شود. نتایج بررسی میانگین و انحراف معیار (SD) و بررسی کراس مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری نشان داد که CCI در گروه بیمار،  $44/85 \pm 21/95$  درصد و در گروه کنترل،  $3/25 \pm 17/66$  درصد می‌باشد. میانگین و انحراف معیار در گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون  $15/85 \pm 69/45$  درصد و در بیماران غیر مبتلا به مقاومت

پلاکتی ایمیون  $32/55 \pm 10/98$  درصد بود. هم چنین در بررسی میانگین آزمایش کراس مچ پلاکتی در سه گروه بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی، بیماران فاقد مقاومت و افراد کنترل مشخص شد که میانگین آزمایش کراس مچ پلاکتی در سه گروه، به صورت معناداری اختلاف دارد ( $p=0/001$ ) (جدول ۳). در بررسی تفاوت میانگین آزمایش کراس مچ پلاکتی در گروه مبتلا به مقاومت پلاکتی

جدول ۲: مقایسه آماری نتایج بررسی CCI در بیماران

| بیماران            | CCI یک ساعته<br>(انحراف معیار $\pm$ میانگین) | CCI ۲۴ ساعته<br>(انحراف معیار $\pm$ میانگین) | ارزش p        |
|--------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------|
| با مقاومت پلاکتی   | $6300 \pm 1202$                              | $5540 \pm 993$                               | $(p = 0/001)$ |
| بدون مقاومت پلاکتی | $10530 \pm 2857$                             | $8470 \pm 1666$                              |               |

ایمیون و افراد نرمال این نتیجه به دست آمد که بین دو گروه تفاوت معناداری وجود دارد ( $p = 0/001$ ). میانگین کراس مچ پلاکتی در گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون و غیر مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون نیز تفاوت معناداری وجود دارد ( $p = 0/005$ ).

جدول ۳: مقایسه آماری نتایج بررسی کراس مچ پلاکتی در بیماران

| بیماران                                    | کراس مچ<br>پلاکتی (درصد) | ارزش p        |
|--------------------------------------------|--------------------------|---------------|
| با مقاومت پلاکتی<br>(۵ نفر با CCI پایین)   | $69/45 \pm 15/85$        | $(p = 0/005)$ |
| بدون مقاومت پلاکتی<br>(۱۰ نفر با CCI بالا) | $32/55 \pm 10/98$        |               |
| گروه کنترل                                 | $17/66 \pm 3/25$         | $(p = 0/001)$ |

نظر می‌رسد با بررسی این عوامل، نمی‌توان درجه و میزان خونریزی را پیش بینی کرد (۲۰).

مقاومت پلاکتی یکی از عوارض تزریق پلاکت می‌باشد که از جمله علل آن می‌توان به علل ایمیون و غیر ایمیون اشاره کرد. بیمارانی که دچار مقاومت پلاکتی ایمیون شده‌اند، برای تزریق پلاکت به آن‌ها باید از پلاکت سازگار استفاده کرد. برای انتخاب پلاکت برای این بیماران می‌توان از سازگاری براساس کراس مچ و سازگاری از نظر HLA بهره برد (۲۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین آزمایش کراس مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری و نتایج CCI همانند CCI یک ساعته، رابطه معکوسی برقرار می‌باشد ( $p = 0/001$ ) و  $p = 0/002$ .

در مقایسه نتایج این مطالعه با دیگر مطالعه‌ها می‌توان به مطالعه ساید اشاره کرد. این مطالعه به منظور بررسی آزمایش کراس مچ پلاکتی برای پیش‌بینی نتایج تزریق پلاکت در بیماران لوسمی حاد توسط وی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام شد. در این مطالعه ۳۹ بیمار شامل ۲۶ فرد بالغ و ۱۳ کودک مورد بررسی قرار گرفتند و ارزش تشخیصی آزمایش کراس مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری را در دو گروه سازگار از نظر HLA و راندوم در این بیماران بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که آزمایش کراس مچ پلاکتی با نتایج تزریق پلاکت ۵۱/۴٪ از بیماران بالغ و ۷۳/۳٪ از کودکان بیمار مرتبط است. تزریق پلاکت در مواردی که آزمایش کراس مچ پلاکتی انجام نشده بود در ۸۳/۳٪ از بالغین و در ۱۰۰٪ کودکان با نتایج ضعیف همراه بود.

آن‌ها هم چنین در تفسیر نتایج خود بیان کرده‌اند که با و بدون سازگاری HLA، روش Cross match پلاکتی

## بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین کراس مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری و نتایج CCI یک ساعته بیماران، یک رابطه منفی معناداری وجود دارد (با  $r = -0/731$  و  $p = 0/002$ ).

مجموعه عواملی از جمله عوامل مربوط به بیمار و ویژگی پلاکت‌های تزریقی بر روی CCI پس از تزریق و خونریزی بالینی در بیماران همراه با ترومبوسیتوپنی، مؤثر می‌باشند. از جمله ویژگی‌های مربوط به پلاکت که در نتایج CCI تأثیر دارد می‌توان به تعداد پلاکت تزریقی، منبع پلاکت (راندوم یا آفرزیس)، سازگاری ABO بین دهنده و گیرنده و مدت نگهداری پلاکت اشاره کرد (۱۹). هنوز مطالعه‌های کاملی از این که تأثیر این عوامل را در پیش‌بینی نتایج تزریق پلاکت بررسی کنند، انجام نشده است و به

معناداری در CCI یک تا چهار ساعته در افراد وجود ندارد. آن‌ها هم چنین به این نتیجه دست یافتند که تفاوت معناداری بین CCI ۱ تا ۴ ساعته در افرادی که برای آن‌ها انتخاب پلاکت بر اساس کراس‌مچ و یا سازگاری HLA انجام شده بود، وجود نداشت.

آن‌ها در نهایت به این نتایج دست یافتند که استفاده از آزمایش کراس‌مچ پلاکتی یا HLA سازگار در مقایسه با پلاکت راندوم مزیت قابل توجهی ندارد. در بیمارانی که شدیداً آلوایمونیزه شده‌اند، پیدا کردن اهداکننده برای آن‌ها دچار مشکل می‌گردد (۲۳).

### نتیجه‌گیری

در حال حاضر استراتژی قابل توصیه برای بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی، تزریق پلاکت سازگار (از نظر HLA) و انجام کراس‌مچ پلاکتی می‌باشد. با توجه به هزینه بالای HLA-typing این آزمایش همواره کاربردی نمی‌باشد. کراس‌مچ پلاکتی قبل از تزریق، روش اضافی برای حصول به تزریق موثر پلاکت در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی می‌باشد که در مقایسه با HLA-matching از نظر انجام هزینه‌های آزمایش‌ها مقرون به صرفه‌تر است.

### تشکر و قدردانی

نتایج این مطالعه از پایان‌نامه دانشجویی مصوب در مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران در مقطع کارشناسی ارشد حاصل شده است.

پیش‌بینی کننده‌ترین روش پاسخ تزریق پلاکت می‌باشد ( $p=0/05$ ). با توجه به مشکلاتی که برای پیدا کردن HLA سازگار برای بیماران دچار لوسمی وجود دارد این آزمایش، روش مفیدی برای انتخاب پلاکت تزریقی می‌باشد (۲۲).

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که بین میانگین آزمایش کراس‌مچ پلاکتی به روش فلوسیتومتری در گروه بیمار و کنترل اختلاف معناداری وجود دارد ( $p=0/001$ ). هم چنین در بررسی میانگین آزمایش کراس‌مچ پلاکتی در سه گروه بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی، بیماران فاقد مقاومت و افراد کنترل این نتایج به دست آمد که میانگین آزمایش کراس‌مچ پلاکتی در بین دو گروه بیمار ( $p=0/005$ ) و هم چنین بین بیماران با گروه کنترل ( $p=0/001$ ) اختلاف معناداری دارد.

استفاده از کراس‌مچ پلاکتی برای پیش‌بینی نتایج تزریق پلاکت در بیماران آلوایمونیزه در مطالعه‌های مختلف نشان داده شده است.

روکس - میس و همکارانش در یک مطالعه، استفاده از کراس‌مچ یا پلاکت سازگار از نظر HLA برای بیماران مقاومت پلاکتی را بررسی کردند و آن‌ها در این تحقیق توصیه نموده‌اند که استفاده از کراس‌مچ یا HLA سازگار برای انتخاب اهداکننده پلاکت، برای مدیریت بیماران دچار مقاومت پلاکتی مفید می‌باشد. آن‌ها در این تحقیق دریافتند که هنگامی که از پلاکت‌های راندوم، کراس‌مچ شده و یا سازگار از نظر HLA استفاده می‌شود، تفاوت

### References :

- 1- Thiagarajan P, Afshar-Kharghan V. Platelet transfusion therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013; 27(3): 629-43.
- 2- Sharma S, Sharma P, Tyler LN. Transfusion of blood and blood products: indications and complications. *Am Fam Physician* 2011; 83(6): 719-24.
- 3- Heal JM, Blumberg N, Masel D. An evaluation of crossmatching, HLA, and ABO matching for platelet transfusions to refractory patients. *Blood* 1987; 70(1): 23-30.
- 4- Freedman J, Gafni A, Garvey M, Blanchette V. A cost-effectiveness evaluation of platelet crossmatching and HLA matching in the management of alloimmunized thrombocytopenic patients. *Transfusion*. 1989; 29(3): 201-7.
- 5- Petz LD, Garratty G, Calhoun L, Clark BD, Terasaki PI, Gresens C, et al. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity. *Transfusion* 2000; 40(12): 1446-56.
- 6- Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol* 2008; 142(3): 348-60
- 7- Slichter SJ, Bolgiano D, Kao KJ, Kickler TS, McFarland J, McCullough J, et al. Persistence of lymphocytotoxic antibodies in patients in the trial to reduce alloimmunization to platelets: implications for using modified blood products. *Transfusion Med Rev* 2011; 25(2): 102-10.
- 8- Lee HJ, Yeom JS, Park JS, Park ES, Seo JH, Lim JY, et al. Clinical Significance of Antibodies Against Platelet HLA Class I in Children with Idiopathic

- Thrombocytopenic Purpura. Korean Journal of Blood Transfusion 2013; 24(3): 233-40
- 9- Kurz M, Knöbl P, Kalhs P, Greinix HT, Höcker P, Panzer S. Platelet-reactive HLA antibodies associated with low post transfusion platelet increments: a comparison between the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test. Transfusion 2001; 41(6): 771-4.
  - 10- Peterson JA, McFarland JG, Curtis BR, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. Br J Haematol 2013; 161(1): 3-14.
  - 11- Curtis B, McFarland J. Human platelet antigens-2013. Vox Sang 2014; 106(2): 93-102.
  - 12- Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. Transfusion 2005; 45(3): 366-73.
  - 13- Arnold DM, Clare R, Salib M, Clayden R, Wang G, Nazi I, *et al.* The McMaster ITP Registry: Assessing the Prevalence, Clinical and Laboratory Features of Immune Thrombocytopenia. Blood 2014; 124(21): 5008-13.
  - 14- Heal JM, Blumberg N. Optimizing platelet transfusion therapy. Blood Rev 2004; 18(3): 149-65.
  - 15- Claas FH. Predictive parameters for *in vivo* alloreactivity. Transpl Immunol 2002; 10(2): 137-42.
  - 16- Döhlinger S, Humpe A, Connor J, Köhler M, Legler TJ. Flow-cytometric screening of platelet antibodies with previously frozen cells. J Immunol Methods 2005; 297(1): 169-75.
  - 17- McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. Transfus Apher Sci 2003; 28(3): 297-305.
  - 18- Gates K, MacPherson BR. Retrospective evaluation of flow cytometry as a platelet crossmatching procedure. Cytometry 1994; 18(3): 123-8.
  - 19- Triulzi DJ, Assmann SF, Strauss RG, Ness P, Hess JR, Kaufman RM, *et al.* The impact of platelet transfusion characteristics on posttransfusion platelet increments and clinical bleeding in patients with hypoproliferative thrombocytopenia. Blood 2012; 119(23): 5553-62.
  - 20- Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, *et al.* Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. Blood 2005; 105(10): 4106-14.
  - 21- Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. Transfus Med Rev 2000; 14(2): 180-96.
  - 22- Sayed D, Bakry R, El-Sharkawy N, Zahran A, Khalaf MR. Flow cytometric platelet cross-matching to predict platelet transfusion in acute leukemia. J Clin Apher 2011; 26(1): 23-8.
  - 23- Rioux-Massé B, Cohn C, Lindgren B, Pulkrabek S, McCullough J. Utilization of cross-matched or HLA-matched platelets for patients refractory to platelet transfusion. Transfusion 2014; 54(12): 3080-7.



Original Article

## Platelet compatibility assessment between AML patients and platelet donors by flow cytometry

Sayyadi M.<sup>1</sup>, Shaiegan M.<sup>1</sup>, Nikougoftar Zarif M.<sup>1</sup>, Vaezi M.<sup>2</sup>, Malek Mohammadi A.<sup>2</sup>, Ahmadi M.H.<sup>1</sup>, Mohammadi S.<sup>2</sup>, Zadsar M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Hematology-Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Shariati Hospital, Tehran, Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

One of the complications of repeated platelet transfusion is immune platelet refractoriness. In this study, a flow cytometric platelet cross-matching was performed to evaluate platelet transfusion outcome.

#### Materials and Methods

In this descriptive study, fifteen patients with a history of multiple platelet transfusions and fifteen healthy participants as the control group were enrolled in this study. Platelet cross-match was done and analyzed by the gate method. EDTA-anticoagulated blood samples from healthy donors were collected and PRP samples were obtained. The serum of each patient was added to platelet suspension and incubated with FITC-anti human IgG and was analyzed using a flow cytometer. Platelet cross-match results of the patients were compared with those of CCI.

#### Results

Platelet cross match results were negatively correlated with 1-hour ( $r = -0.731$ ,  $p = 0.002$ ) and 24-hour ( $r = -0.794$ ,  $p = 0.001$ ) CCIs. There was a significant difference in the mean percentage of platelet crossmatch between the patients with immune platelet refractoriness (showing 1-hour CCIs less than 7500) and that of the control group and the patients without platelet refractoriness.

#### Conclusions

The results showed that there was a significant correlation between platelet cross match by flowcytometry and 1-hour CCI results and this method could be applicable in the evaluation of platelet transfusion outcome.

**Key words:** Flow Cytometry, Crossmatching, Blood, Platelet-Rich Plasma

Received: 4 Aug 2015

Accepted: 26 Dec 2015

Correspondence: Shaiegan M., PhD of Immunology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.  
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601564; Fax: (+9821) 88601599  
E-mail: M.Shaiegan@ibto.ir