خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۶ شماره ۲ تابستان ۹۸ (۱۰۲-۹۱)

مقاله پژوهشی

بررسی آنتی ژن‌ها و آنتی بادی‌های پلاکتی در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی

محبوبه مستخدمین حسینی[۱]، مژگان شایگان[۲]، شهرام سمیعی[۳]، سعید محمدی[۴]، حسن جلایی‌خو[۵]، پردیس طباطبایی‌پناه[۶]، سارا مدرسی[۷]

چکیده

سابقه و هدف

مقاومت پلاکتی ایمیون از عوارض انتقال خون در بیماران با تزریق مکرر پلاکت می‌باشد. در این عارضه آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های سطحی پلاکت شامل آنتی‌ژن های اختصاصی و آنتی‌ژن‌های سازگاری یافتی ایجاد می‌شوند که می‌توانند باعث تخریب پلاکت‌های تزریق شده به وسیله سلول‌های بیگانه خوار و ماکروفاژ گردند. در مطالعه حاضر، آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های اختصاصی و آنتی‌بادی‌های ضد HLA-I در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، بررسی هم زمان آنتی‌ژن‌ها HPA-1/-2/-3-4-5-15 (به روش مولکولی PCR-SSP)، غربالگری حضور آنتی‌بادی‌های پلاکتی(به روش فلوسیتومتری) و بررسی آنتی‌بادی‌های ضد HLA-I به روش پانل راکتیو آنتی‌بادی در سرم ۴۹ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی انجام شدند. یافته‌ها توسط نرم‌افزار فلومکس و نرم‌افزار محاسبه‌گر خودکار هاردی وینبرگ تجزیه، تحلیل شدند.

یافته‌ها

از ۴۹ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی، ۱۸ بیمار زن و۳۱ بیمار مرد بودند. شمارش پلاکتی در زنان ۳۲۰۲ ± ۶۴۵۷ در محدوده(۱۰۰۰۰-۱۰۰۰سلول در میکرولیتر) با شمارش پلاکتی در مردان ۲۵۱۸ ± ۷۲۸۳ در محدوده (۱۰۰۰۰-۳۰۰۰) اختلاف معنادار نداشت. هیچ موردی از HPA-4b ، HPA -5b در این مطالعه دیده نشد. آنتی‌بادی‌های ضد HLA در۶۱/۲٪ و آنتی‌بادی‌های ضد HPA در ۴٪ بیماران مورد بررسی مشاهده شدند.

نتیجه گیری

اطلاعات حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی آلل a برای 5-/ 4- /3- /HPA-1 و آلل b برای - /HPA-2/ 15 در جمعیت مورد مطالعه بیشتر بود. وفور آللی و ژنوتیپی بین گروه بیمار مورد مطالعه و جمعیت اهداکنندگان ایرانی می‌تواند توضیح دهنده وقوع مقاومت پلاکتی در آن‌ها باشد.

کلمات کلیدی: **پلاکت‌ها، فلوسیتومتری، آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌ها**

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/ ۱
تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ واحد تهران شرق- دانشگاه آزاد اسلامی ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مربی مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- PhD هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی ـ بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۵- فوق تخصص خون و انکولوژی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش ـ تهران ـ ایران
۶- دکترای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی ـ واحد تهران شرق ـ تهران ـ ایران
۷- پزشک عمومی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و اداره کل انتقال خون تهران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

مقدمه

مقاومت پلاکتی (Platelet refractoriness, *PR*) 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(Corrected Count Increment) CCI یک ساعته و۲۴ ساعته پس از تزریق پلاکت، می‌توان به مقاومت پلاکتی پی برد(۲، ۱). ایجاد مقاومت پلاکتی و افزایش نیافتن تعداد پلاکت، باعث خونریزی شدید و احتمالاً مرگ ناشی از خونریزی می‌شود(۳). علل ایجاد مقاومت پلاکتی، ایمیون وغیر ایمیون می‌باشد. از علل غیر ایمیون می‌توان به تب، عفونت، اسپلنومگالی، انعقاد منتشر درون عروقی و مصرف برخی داروها نظیر هپارین اشاره کرد. در مقاومت پلاکتی ایجاد شده به یکی از دلایل فوق، میزان CCI در ۲۴-۱۸ ساعت بعد از تزریق کمتر، از pt/µL ۴۵۰۰ خواهد شد. در مقاومت پلاکتی ایمیون،آلوآنتی‌بادی علیه HLA (Human Leukocyte Antigens) ایجاد می‌گردد و در این موارد CCI یک ساعته کمتر از pt/µL ۷۵۰۰ می‌شود(۵، ۴). در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی که آلوآنتی‌بادی دارند باید، پلاکت سازگار با سرم بیمار نظیر HLA, HPA (Human platelet Antigen) انتخاب شود. گلیکوپروتئین‌های غشاء پلاکتی، نقش حیاتی در فعالیت‌های انعقادی پلاکت ایفا می‌کنند. این گلیکوپروتئین‌ها به عنوان آلوآنتی‌ژن، اتو آنتی‌ژن و یا آنتی‌ژن‌های هدف برای آنتی‌بادی‌های مختلف نیز عمل می‌کنند. مثل آلوآنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت HPA که حاصل پلی‌مورفیسم در گلیکوپروتئین‌های غشاء پلاکت می‌باشند(۶). ابتدا تصور می‌شد که این آنتی‌ژن‌ها به طور اختصاصی روی پلاکت‌ها و مگاکاریوسیت‌ها قرار دارند اما اکنون مشخص شده که بسیاری از آن‌ها محدوده توزیع وسیع‌تری دارند و روی مولکول‌های چسبنده بین سلول‌ها و ماتریکس، سلول‌های T فعال و سلول‌های آندوتلیال هم دیده می‌شوند(۸، ۷). آلوایمیونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت می‌تواند در افراد سالم به دنبال حاملگی، تزریق خون، پیوند و نسبت به آنتی‌ژن‌هایی که گیرنده فاقد آن‌ها هستند، رخ دهد و بر خلاف آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های گلبول‌های قرمز به صورت طبیعی ساخته نمی‌شوند(۹). پنج عارضه به دلیل آلوایمیونیزاسیون و به دنبال ناسازگاری آنتی‌ژن‌های پلاکتی روی می‌دهند نظیر ترومبوسیتوپنی آلوایمیون نوزادان(NAITP ، Neonatal Allo Immune Thrombocytopenia)، پورپورای پس از تزریق (PTP و Post Transfusion Purpura)، مقاومت پلاکتی(PTR ، Platelet Transfusion Refractoriness)، ترومبوسیتوپنی آلوایمیون(PAT ، Passive Alloimmune Thrombocytopenia)، ترمبوسیتوپنی آلوایمیون بعد از پیوند TAT (Tranplantation-Associated Alloimmune) (۱۰). آنتی‌ژن‌های پلاکتی جزو مولکول‌های سازگاری نسجی فرعی(MHC Minor Histocompatibility Complex) هم شمرده شده‌اند و در بروز واکنش GVHD حاد(Graft Versus Host Disease) بعد از پیوند سلول‌های بنیادی خونساز نیز نقش دارند(۱۱). مقاومت پلاکتی اصولاً در افرادی که مصرف دائمی پلاکت، به صورت درمانی و یا به صورت پیشگیری دارند، به وجود می‌آید که در ۶۰-۲۰ درصد موارد به دلیل حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HLA-I (A,B) می‌باشد. در ۱۰٪ از این افراد هم‌زمان آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های پلاکتی هم قابل تشخیص است(۱۲). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۳در سازمان انتقال خون ایران انجام شد، آنتی‌بادی‌های پلاکتی با یکی از دستورالعمل‌های موجود به روش فلوسیتومتری(با حذف HLA-I) در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی، آنمی آپلاستیک و IPT (Immune Thrombocytopenic Purpura) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نتایج این مطالعه نشان داد که ۵۳/۷٪ از این بیماران دارای آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HLA-I و ۴۳/۹٪ دارای آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های پلاکتی بودند و ۳۱/۷٪ هر دو نوع آنتی‌بادی را داشتند(۱۱).

مهم‌ترین آلوآنتی‌ژن‌های پلاکتی درگیر در مقاومت پلاکتی، HPA-1a ، -5b ، -2b قید شده‌اند(۱۲). با توجه به اطلاعاتی که در زمینه مولکولی در مورد سیستم HPA شناخته شده و لزوم تشخیص سریع و صحیح آلوایمیونیزاسیون پلاکتی و هم چنین نیاز به داشتن پلاکت‌های سازگار از نظر آنتی‌ژن‌های پلاکتی برای درمان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

مؤثر بیماران و در نتیجه آن نیاز به تعیین آلوآنتی‌ژن‌های پلاکتی در دهنده و گیرنده پلاکت، بررسی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های پلاکتی دارای اهمیت هستند(۱۴، ۱۳). هم چنین طی یک مطالعه آنتی‌ژن‌های پلاکتی به روش مولکولی نیز برای اهداکنندگان خون در استان تهران بررسی گردید(۱۵). لذا با توجه به تجارب عملی برای روش مولکولی، در مطالعه حاضر هم زمان آنتی‌ژن‌های پلاکتی (به روش مولکولی) و آنتی‌بادی‌های پلاکتی(به روش فلوسیتومتری) و بررسی آنتی‌بادی‌های ضد HLA-I (به روش panel reactive antibody) در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. ۴۹ فرد بیمار دریافت‌کننده مکرر فرآورده حاوی پلاکت با CCI یک ساعته کمتر از ۷۵۰۰ pt/µL با تشخیص مقاومت ایمیون و فاقد سابقه تب، مصرف هپارین و آمفوتریسین B، خونریزی منتشر، عفونت‌های مختلف، بزرگی کبد و طحال و پیوند سلول‌های بنیادی خونساز، از بیمارستان شریعتی و بیمارستان ۵۰۱ ارتش پس از دریافت رضایت‌نامه با کد(TMI.REC.1396.001) در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۵ الی بهمن ۱۳۹۶ وارد مطالعه شدند. بیماری‌های زمینه‌ای در بیماران وارد شده به این مطالعه لوکمیای حاد لنفوبیدی(۳۲/۶٪) و میلوییدی(۴۱٪)، مالتیپل میلوما(۲۴/۴٪) و ۱ نفر نوروبلاستوما(۲٪) بودند. پس از نمونه‌گیری از اهداکنندگان، لوله‌ها در دمای محیط سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. در فاصله ۳ ساعت از نمونه‌گیری، بافی‌کوت حاوی گلبول‌های سفید آن جدا شده و استخراج DNA با استفاده از ستون فیلتردار سیلیکایی در کیت کیاژن بر اساس لیز سلول‌ها و آزاد شدن ژنوم از پروتئین‌ها DNA به سیلیکا ژل غشاء ستون کیت کیاژن متصل می‌شود. سپس جذب نوری اسید نوکلئیک در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتری اندازه‌گیری شد(۱۶). بخش سرمی نمونه نیز در دمای ۷۰°C- تا زمان بررسی آنتی‌بادی‌ها به روش فلوسیتومتری در چند میکروتیوب تقسیم و نگهداری شد.

بررسی مولکولی آنتی‌ژن‌های پلاکتی:

برای تعیین ژنوتیپ آلل‌های a و b آنتی‌ژن‌های HPA-1/2/3/4/5/15 از روش PCR-SSP استفاده گردید. برای هر آلل لوله جداگانه و در نهایت برای هر نمونه DNA ، واکنش در ۱۲ لوله جداگانه انجام شد. توالی آغازگرها(محصول بایونیر کره) که از طریق شرکت تکاپو زیست تهیه شدند در جدول آمده است(جدول ۱). حجم کلی محتوای واکنش ۲۰ میکرولیتر(شامل ۴ میکرولیتر نمونه DNA ، ۱۰/۳ میکرولیتر از مخلوط واکنش و ۵/۷ میکرولیتر از مخلوط آغازگرها) در هر لوله بود. مخلوط آغازگرها خود شامل یک میکرولیتر از هر یک از آغازگر مخصوص آلل(allele specific primer)، آغازگر مشترک دو آلل(common primer)، یک جفت آغازگر بتاکتین(به عنوان کنترل داخلی و کنترل مثبت واکنش) PCR و۳/۷ میکرولیتر dH_2O بود که مقدار مصرفی هر کدام بسته به غلظت نهایی مورد نظر برای آن آغازگر داشت.

مقدار آنزیم DNA تک پلی‌مراز(۱۰۰۰ Units ، رُوش) برای هر واکنش ۰/۳ میکرولیتر بود که به مخلوط واکنش اضافه شد. مخلوط واکنش شامل: ۱۰ میکرولیتر از 2x Master Mix برای هر لوله واکنش می‌باشد. غلظت نهایی $Mgcl_2$ در همه واکنش‌ها ۱/۵ میلی‌مول در نظر گرفته شد. واکنش PCR در ترموسایکلر بیوراد(TC135) انجام گرفت. چرخه انجام PCR برای تکثیر به شرح زیر بود:

پس از یک دقیقه انکوباسیون در دمای ۹۶°C برای فعال شدن، چرخه آمپلیفیکاسیون در ۳ مرحله در نظر گرفته شد. مرحله اول ۵ چرخه شامل: ۹۶°C به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۸°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم ۲۰ چرخه شامل: ۹۶°C به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۱°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله سوم ۱۵چرخه شامل: ۹۶°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۱°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش در پایان با مرحله Elongation شامل ۱ چرخه در ۷۲ °C به مدت ۳ دقیقه، تکمیل شد. پس از انجام مراحل تکثیر، برای الکتروفورز در روی ژل آگاروز ۲٪، محصولات PCR به نسبت ۱ به ۴ با ماده رنگی سایبرگرین مخلوط

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

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

سیستم	آنتی‌ژن	توالی آغازگر	اندازه(bp)
HPA-1	1a	5' TCA CAG CGA GGT GAG GCC A 3' 5' GGA GGT AGA GAG TCG CCA TAG 3'	۹۰
	1b	5' ACT TAC AGG CCC TGC CTC C 3' 5' AGC CGG AGT GCA ATC CTC TG 3'	۱۹۶
HPA-2	2a 2b Common	5' GCCCCCAGGGCTCCTGAC 3' 5' GCCCCCAGGGCTCCTGAT 3' 5' TCAGCATTGTCCTGCAGCCA 3'	۲۵۸
HPA-3	3a 3b Common	5' GGG GGA GGG GCT GGG GA 3' 5' GGG GGA GGG GCT GGG GC 3' 5' GGC CCT GGG ACT GTG AAT G3'	۲۹۳
HPA-4	4a 4b Common	5' CTG GCC ACC CAG ATG CG 3' 5' CTG GCC ACC CAG ATG CA 3' 5' GGT AGA AAG GAG CTA TAG TTT GGC 3'	۲۵۲
HPA-5	5a 5b Common	5' AGA GTC TAC CTG TTT ACT ATC AAA G 3' 5' AGA GTC TAC CTG TTT ACT ATC AAA A 3' 5' CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA CA 3'	۲۴۶
HPA-15	15a 15b Common	5' TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT CG 3' 5' TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT CT 3' 5' ATG AAC CTT ATG ATG ACC TAT TC 3'	۲۲۵
βActin	جلوبرنده معکوس	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	۴۵۰

شده و باندهای حاصله با ترانس ایلومیناتورUV در طول موج ۳۲۰ نانومتر مشاهده و با استفاده از Gel DOC عکس‌برداری صورت گرفت و در نهایت عکس‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

تفسیر نتایج روش PCR:

غلظت آغازگرهای بتااکتین که به عنوان کنترل داخلی در هر واکنش لحاظ شده‌اند طوری محاسبه گردیده که کمتر از آغازگرهای اصلی باشند و در هنگام تکثیر، رقابتی ایجاد نکنند و در نتیجه وجود باند کنترل داخل مؤید صحت روند آزمایش و مواد مورد استفاده می‌باشد. باندهای مربوط به آلل‌ها با استفاده از سایز مارکر و مقایسه آن با باند موجود در هر ردیف تشخیص داده شدند(جدول ۱). نتایج قرائت شده، یادداشت گردیدند و سپس وفور موارد مشاهده شده با موارد قابل انتظار طبق قانون هاردی وینبرگ و با استفاده از آزمون آماری کای‌دو مقایسه گردید. در صورت عدم اختلاف یعنی موارد مشاهده شده با موارد قابل انتظار طبق قانون هاردی وینبرگ مطابقت دارد و با وارد کردن فراوانی آللی موارد هموزیگوت و هتروزیگوت در نرم‌افزار محاسبه‌گر خودکار هاردی وینبرگ(بر اساس معادله۱= a^2+b^2+2ab)، وفور آلل‌های a و b برای آنتی‌ژن‌های پلاکتی محاسبه شدند. برای مقایسه فراوانی نسبی ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف نیز از مقایسه نسبت‌ها با آزمون کای‌دو و نرم‌افزار SPSS۱۹ استفاده شد.

مقدار p< ۰/۰۵ بیانگر تفاوت معنادار می‌باشد. در صورت فقدان باند، تنها در حالتی جواب را منفی و به عنوان عدم حضور آلل تلقی می‌کنیم که تکثیر ژن کنترل (ژن بتا اکتین) صورت گرفته و باندی به اندازه bp ۴۵۰ در الکتروفورز مشاهده شود.

بررسی آنتی‌بادی‌های پلاکتی به روش فلوسیتومتری:

ابتدا Pooled پلاکتی از گروه خون O تهیه شد. نمونه‌های خون کامل که از ۵ فرد سالم در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شده بود، توسط آنتی‌سرم گروه‌بندی(ABO(LORNE گروه‌بندی گردید. این لوله با نیروی ۲۰۰ گرم به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، خون کامل به سه قسمت تبدیل گردید. قسمت ته لوله حاوی RBC ، قسمت میانی بافی‌کوت و قسمت رویی حاوی پلاسما و پلاکت بود که به آن

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

پلاسمای غنی از پلاکت(Platelet Rich Plasma ، PRP) گفته می‌شود. در این مرحله با سمپلر و به آرامی PRP از لوله جدا و در یک لوله مجزا ریخته شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از آن با دستگاه سل کانتر شمارش و تعداد کل پلاکت درPRP مورد نظر محاسبه گردید. زیرا جهت انجام آزمایش‌های بعدی نیاز به تعداد $10^5 \times 10$ mL پلاکت افراد با گروه خون O بود. ۵۰ میکرولیتر از Pooled PRP را در لوله فلوسیتومتری ریخته و ۵۰ میکرولیتر ازسرم بیمار را به آن می‌افزاییم. در لوله کنترل فقط سوسپانسیون و بافر به جای سرم بیمار در لوله جداگانه اضافه گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. تا واکنش مناسب بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی صورت گیرد و پس از طی زمان انکوباسیون، سوسپانسیون ۳ مرتبه با PBS (نیروی ۲۰۰۰g و زمان ۱۰ دقیقه) شست و شو داده شد. پس از آخرین مرحله شست و شو، به رسوب زیرین از آنتی‌هیومن گلوبولین کونژوگه با FITC (محصول داکو) اضافه گردید. آنتی‌سرم مذکور در غلظت نهایی ۱/۳۰ با PBS رقیق شده و به لوله ± واکنش، ۵۰ میکرولیتر اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در محیط آزمایشگاه انکوبه شد. سپس یک بار با محلول شستشو PBS ، ۱۰دقیقه در دور ۲۰۰g سانتریفیوژ گردید. مایع رویی را دور ریخته برای آنالیز به دستگاه فلوسیتومتری داده شد و تا event ۱۰۰۰۰قرائت شد(۱۷). روش فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه partec-cyFlow انجام شد و توسط نرم‌افزار فلومکس آنالیز گردید. در روش فلوسیتومتری در هر ران کاری یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه سرم منفی و کنترل ایزوتایپ هم جهت کنترل استفاده شدند. برای تنظیم نمودارها و ولتاژ دستگاه و شروع خوانش، ابتدا لوله حاوی ایزوتایپ کنترل به دستگاه فلوسیتومتری داده می‌شود.

بررسی آنتی‌بادی‌های ضد انجام آزمایش(PRA) Panel Reactive antibody:

بررسی آنتی‌بادی‌های ضد گلبول‌های سفید با استفاده از آزمایش PRA به روش لنفوسایتوتوکسیسیتی با کمپلمان(CDC) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۴ میلی‌لیتر نمونه خون کامل در لوله ژل‌دار از افراد دریافت گردید و سپس با سانتریفوژ لوله‌ها در ۳۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه، نمونه سرم جدا شده و در دمای $-70^{\circ}C$ تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. به طور خلاصه ابتدا لنفوسیت‌های افراد ظاهرا سالم را جدا و به تعداد 3×10^6 cells/mL سوسپانسیون نموده و سپس به حجم یک میکرولیتر به چاهک‌های پلیت ترازاکی اضافه شدند. برای هر نمونه در این مطالعه سلول‌های جدا شده از ۴۰ فرد مختلف به ۴۰ حفره پلیت ترازاکی اضافه و سپس به میزان یک میکرولیتر از سرم مورد بررسی نیز اضافه شد. ۳۰ دقیقه در $37^{\circ}C$ قرار داده و سپس ۵ میکرولیتر کمپلمان خرگوش (محصول شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون) به چاهک‌ها اضافه شد. یک ساعت و نیم در $37^{\circ}C$ قرار داده و سپس به محتویات هر چاهک ۲ میکرولیتر رنگ ائوزین y اضافه و پس از یک تا دو دقیقه ۱۰ میکرولیتر فرمالین ۷۳٪ به چاهک‌ها اضافه شد. وقوع یا عدم وقوع واکنش لیز یا سمیت سلولی با میکروسکوپ معکوس (درشت نمایی 10X) به صورت مثبت یا منفی یادداشت شدند(دستورالعمل 99.OT.021.SOP/01 = سازمان انتقال خون ایران). برای تفسیر نتایج مثبت برای واکنش PRA ، حداقل ۱۰٪(و بیشتر) از سلول‌های مورد بررسی مبنای گزارش مثبت قرار گرفته به صورت درصد گزارش شدند(۱۹-۱۸). تعداد موارد مثبت در بین زنان و مردان ثبت و درصد واکنش‌های مشاهده شده به عنوان شدت واکنش یادداشت گردیدند.

یافته‌ها

۱۹ بیمار(۳۸/۸٪) زن و ۳۱ بیمار(۶۱/۲٪) مرد بودند. میانگین سنی در گروه زنان ۲۴/۵ ± ۳۴/۵۰۷ سال و در محدوده سنی ۸۳-۲ سال و در مردان ۲۱/۷ ± ۴۱/۰۱ سال با محدوده سنی ۸۰-۴ سال بود که اختلاف معناداری نداشت. شمارش پلاکتی در زنان ۳۲۰۲ ± ۶۴۵۷ در محدوده(۱۰۰۰۰-۱۰۰۰)با شمارش پلاکتی در مردان ۲۵۱۸ ± ۷۲۸۳ در محدوده(۱۰۰۰۰-۳۰۰۰) اختلاف معناداری نداشت(جدول ۲). نتایج PRA در ۱۹ نفر(۳۸/۸٪ شامل ۹ مرد و ۱۰ زن) منفی یا کمتر از ۱۰٪

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

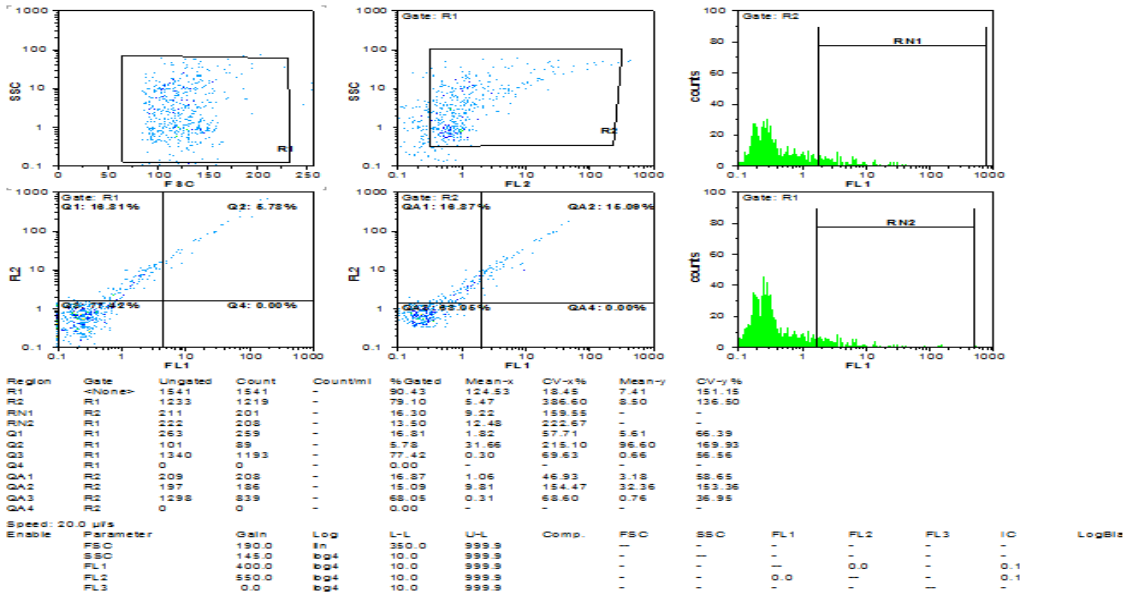
جدول ۲: مقایسه نتایج PRA در زنان و مردان مورد مطالعه

درصد پاسخ PRA	زنان	مردان	مجموع
کمتر از ۱۰٪	۱۰	۹	۱۹
۱۰٪	۲	۵	۷
۱۵٪	۳	۵	۸
۲۰٪	۱	۲	۳
۲۵٪	–	۱	۱
۳۰٪	–	۲	۲
۳۵٪	۱	–	۱
۵۰٪	۱	۵	۶
۵۵٪	–	۱	۱
۶۵٪	–	۱	۱
مجموع	۱۸	۳۱	۴۹

بود. ۳۰ نفر(۶۱/۲٪ ، شامل ۲۲ مرد و ۸ زن) این آنتی‌بادی‌ها را (PRA≥ ۱۰٪) در سرم خود داشتند. پاسخ مثبت PRA در زنان و مردان با یکدیگر تفاوتی نداشت.

در بیماران گر چه بین پاسخ مثبت PRA و تعداد فرآورده پلاکتی مصرفی ارتباط معکوسی مشاهده شد، اما این ارتباط معنادار نبود. بین این دو متغیر به تفکیک جنسیت نیز در مردان و در زنان ارتباط معناداری مشاهده نشد. به عبارتی در این مطالعه پاسخ مثبت PRA با تعداد فرآورده مصرفی ارتباطی نداشت.

بین پاسخ مثبتPRA با شمارش پلاکتی یک ساعت بعد از تزریق گر چه همبستگی ضعیف و معکوسی وجود داشت. اما این ارتباط معنادار نبود. رابطه بین پاسخ مثبت PRA با شمارش پلاکتی ۲۴ ساعته بعد از تزریق نیز معنادار نشد. شدت فلورسنت قرائت شده در روش فلوسیتومتری برای ۴۹ نمونه مورد بررسی در محدوده ۱۶/۹۱٪-۱/۳۳٪ بود که میانگین و انحراف استاندارد برای آن‌ها محاسبه شد. برای تعیین cut off اگر درصد قرائت شده شدت فلورسنت برای فرد از M+2SD شدت فلورسنت(MF) قرائت شده، بزرگتر شد، نتیجه مثبت و اگر کمتر بود منفی تلقی شدند(۱۷). مقدار مذکور در مطالعه ما ۱۰/۸٪ حاصل شد. در کل ۲ نفر از نظر آنتی‌بادی ضد HPA مثبت شدند. در یک خانم با شمارش پلاکتی یک ساعت بعد از تزریق ۵۰۰۰ میکرولیتر، نتیجه فلوسیتومتری(۱۶/۳۰٪) برای آنتی‌بادی‌های ضد HPA و نتیجه PRA=۳۵٪ مثبت برای آنتی‌بادی‌های HLA ، برای هر دو آنتی‌بادی مثبت قلمداد شد(نمودار ۱).

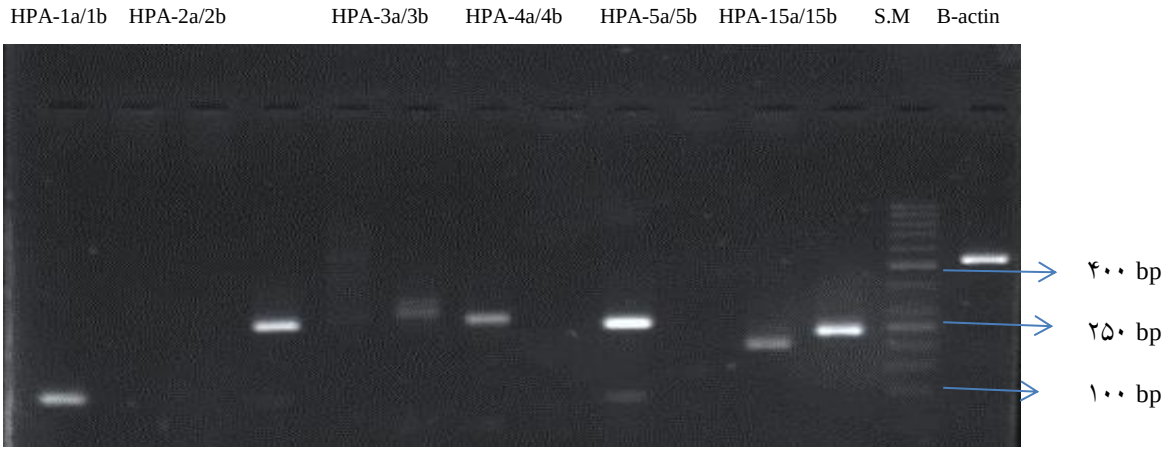


نمودار ۱: سیتوگرام نمونه مثبت آنتی‌بادی‌های ضد HPA در این مطالعه(۱۶/۳٪ = RNA1) به روش فلوسیتومتری

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

جدول ۳: فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپی و فراوانی آللی(ژنی) آنتی‌ژن‌های مختلف پلاکتی در بیماران مورد مطالعه

HPA Genotypes	تعداد	درصد	HPA Alleles
HPA-1a/1a	۱۶	۳۴	HPA-1a
HPA-1a/1b	۲۷	۵۷/۵	HPA-1b
HPA-1b/1b	۴	۸/۵	
HPA-2a/2a	۴	۸/۲	HPA-2a
HPA-2a/2b	۳۸	۷۷/۶	HPA-2b
HPA-2b/2b	۷	۱۴/۲	
HPA-3a/3a	۲۹	۵۹/۲	HPA-3a
HPA-3a/3b	۸	۱۶/۳	HPA-3b
HPA-3b/3b	۱۲	۲۴/۵	
HPA-4a/4a	۴۹	۱۰۰	HPA-4a
HPA-4a/4b	۰	۰	HPA-4b
HPA-4b/4b	۰	۰	
HPA-5a/5a	۴۹	۱۰۰	HPA-5a
HPA-5a/5ba	۰	۰	HPA-5b
HPA-5b/5b	۰	۰	
HPA-15a/15a	۸	۱۶/۳	HPA-15a
HPA-15a/15b	۱۴	۲۸/۶	HPA-15b
HPA-15b/15b	۲۷	۵۵/۱	



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن‌های مختلف HPAs : از سمت چپ به راست: ستون اول و دوم مربوط به آلل‌های HPA-1a/ 1b، ستون‌های سوم و چهارم مربوط به آلل‌های HPA-2a/2b ، ستون‌های ۵ و ۶ مربوط به آلل‌های HPA-3a/3b ، ستون‌های ۷ و ۸ مربوط به آلل‌های HPA-4a/4b ، ستون‌های ۹ و ۱۰ مربوط به آلل‌های HPA-5a/5b و ستون‌های ۱۱ و۱۲ مربوط به آلل‌های HPA-15a/15b ، ستون اول از سمت چپ مربوط به بتااکتین(کنترل داخلی) و ستون دوم از چپ سایز مارکر ۵۰ bp می‌باشند.

نتیجه قرائت به شرح زیر بود:

$HPA\text{-}1a^{+}/1b^{-}$ ،$HPA\text{-}2a^{-}/2b^{+}$ ،$HPA\text{-}3a^{-}/3b^{+}$ /$HPA\text{-}4a^{+}/4b^{-}$ / $HPA\text{-}5a^{+}/5b^{-}$/ $HPA\text{-}15a^{+}/15b^{+}$

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

ژنوتیپ وی: HPA-1a/1a ، HPA-2a/2a ، HPA-3a/3b ، HPA-4a/4a ، HPA-5a/5a و HPA-15a/15 بود. نمونه دوم مربوط به یک آقا با شمارش پلاکتی یک ساعت بعد از تزریق ۵۰۰۰ میکرولیتر، با نتیجه فلوسیتومتری ۱۱/۴۸٪ مثبت برای آنتی‌بادی‌های ضد HPA و PRA منفی برای آنتی‌بادی‌های HLA و ژنوتیپ: HPA-1a/1b، HPA-2a/2b، HPA-3a/3b، HPA-4a/4a ، HPA-5a/5a و HPA-15a/15b بود. در کل ۱۸ بیمار علی‌رغم نقص در CCI یک ساعته(ابتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون) در این طرح فاقد هر گونه آنتی‌بادی ضد HLA و ضد HPA به روش‌های به کار رفته، بودند.

یافته‌های آزمایش PCR-SSP:

در الکتروفورز ژل برای HPA-1 برای دو نمونه، نتایج مناسبی حاصل نشد و محاسبات وفور آلل‌های a وb آن بر مبنای ۴۷ نفر انجام گرفت. در سایر موارد نتایج برای ۴۹ نفر کامل شدند. در این مطالعه هیچ یک از افراد آلل b برای HPA-4, -5 نداشتند. وفور آلل a برای آنتی‌ژن‌های HPA-1, -2, -3 بیشتر از آلل b به دست آمد اما وفور HPA-15b از آلل HPA-15a در این مطالعه بیشتر شد (جدول ۳)(شکل ۱).

بحث

این مطالعه بر روی ۴۹ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون انجام شد. وفور آلل‌های آنتی‌ژن‌های پلاکتی HPA-1a و HPA-1b به ترتیب ۰/۶ و ۰/۴، HPA-2a وHPA-2b به ترتیب۰/۴۷ و ۰/۵۳، HPA-3a و HPA-3b به ترتیب ۰/۷۵ و ۰/۲۵، HPA-4a دارای فراوانی ژنی ۱ (یا ۱۰۰٪)، HPA-5a نیز دارای فراوانی ۱ (یا ۱۰۰٪) و HPA-15a و HPA-15b به ترتیب ۰/۳۱ و ۰/۶۹ بود. HPA-4b و HPA-5b در هیچ یک از افراد مشاهده نشد. فراوان‌ترین میزان هموزیگوسیتی در بین افراد مورد بررسی مربوط به HPA-5a/5a و HPA-4a/4a با ۱۰۰٪ و سپس HPA-3a/3a با وفور ۵۵/۱٪ بود. کمترین میزان هموزیگوسیتی مربوط به HPA-1a/1a (با وفور ۸/۵٪) و HPA-2a/2a (با وفور ۸/۲٪) است. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط HPA-2a/1b (با وفور۷۷/۶٪) و HPA-1a/1b (با وفور ۵۷/۵٪) و کمترین میزان هموزیگوسیتی مربوط به HPA-3a/3b (با وفور ۱۶/۳٪) است.

۳۰ نفر(۶۱/۲٪) از بیماران، آنتی‌بادی ضد HLA داشتند و ۱۹ نفر فاقد این آنتی‌بادی‌ها بودند. دو نفر(۴/۱٪) دارای آنتی‌بادی ضد HPA بودند که یک نفر از آن‌ها دارای آنتی‌بادی ضد HLA نیز بود. وفور گزارش شده برای آنتی‌بادی‌های ضد HLA و ضد HPA در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکت به ترتیب۶۰٪–۲۰٪ و ۲۵٪–۸٪ می‌باشد که در بسیاری موارد با آنتی‌بادی‌های ضد HLA همراهند (۲۰، ۱۲). در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۳ در سازمان انتقال خون ایران، در مورد آنتی‌بادی‌ها در بیماران مبتلا به اختلالات خونی مانند لوسمی حاد و آنمی آپلاستیک که به درمان با پلاکت پاسخ مناسب نداده بودند، مشخص شد وفور آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های HLA-I برابر۵۳/۷٪ و وفور آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های پلاکتی ۴۳/۹٪ بود که ۳۱/۷٪ افراد دارای هر دو نوع آنتی‌بادی بودند(۱۱). در مطالعه‌ای در مورد بررسی و شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد HPA در ۲۰۴ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی(به روش الایزا) در آلمان و چین، مشخص شد که ۱۱۴ نفر (۵۵/۸۸٪) آن‌ها دارای این آنتی‌بادی‌ها هستند و از این ۱۱۴ نفر، تعداد ۱۱۰ (۹۶/۵٪) نفر فقط آنتی‌بادی ضد HLA، ۲ نفر فقط آنتی‌بادی ضد پلاکتی و ۲ نفر هر دو آنتی‌بادی را داشتند(۲۱). وفور این آنتی‌بادی‌ها در بیماران این مطالعه در محدوده مطالعه‌های مشابه قبلی قرار می‌گیرند.

در سرم ۱۸ نفر از افراد مطالعه حاضر که CCI یک ساعته آن‌ها کمتر از ۷۵۰۰pt/μL بود(بیانگر ابتلا به مقاومت پلاکتی ایمن)، آنتی‌بادی ضد HLA دیده نشد. علت این امر این است که آنتی‌بادی ضد HLA در این تحقیق با روش سمیت سلولی وابسته به کمپلمان بررسی شدند. سمیت سلولی وابسته به کمپلمان از سال ۱۹۶۰ و تا سال‌ها بعد به عنوان معیار استاندارد برای بررسی آنتی‌بادی‌های ضد HLA به کار گرفته شد. اما این روش قادر به ردیابی برخی آنتی‌بادی‌هایی که از نظر بالینی مهم هستند، دارا نمی‌باشد(۲۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

هم چنین مطرح شده است گرچه سال‌ها آنتی‌بادی‌ها تنها روش حذف ایمونولوژیک پلاکت‌ها شناخته شدند اما مطالعه‌ها، حذف ایمونولوژیک پلاکت در غیاب آنتی‌بادی‌ها را مطرح کرده‌اند.

تخریب پلاکت‌ها در غیاب آنتی‌بادی به عوامل غیر ایمونولوژیک نسبت داده شده اما در برخی بیماران فاقد آنتی‌بادی، عوامل غیر ایمونولوژیک نیز در تخریب پلاکت‌ها مطرح نیستند و در این رابطه به نقش سلول‌های $TCD8^+$ در پاکسازی پلاکت‌ها در غیاب آنتی‌بادی اشاره شده‌اند و مطرح گردیده این مکانیسم در بیماران مقاومت پلاکتی نیز قابل استناد است(۲۳).

فراوانی آنتی‌ژن‌های پلاکتی در اهداکنندگان خون در کشورهای مختلف از جمله در ایران بررسی شده است. وفور ژنی یا آللی آنتی‌ژن‌ها در اهداکنندگان خون در کشورهای مختلف شامل انگلستان، چین، ژاپن، بحرین، اسپانیا، فنلاند، اتریش، کره، آمریکا، عربستان، تایلند و هم چنین ایران در محدوده‌های زیر به دست آمده‌اند: HPA-1a : ۰/۷۵، HPA-1b : ۰/۰۱– ۰/۲۵، HPA-2a : ۰/۵۴–۰/۹۶ ، HPA-2b : ۰/۰۴–۰/۴۶ ، HPA-3a:۰/۴۸–۰/۹۵، HPA-3b :۰/۰۵–۰/۵۲، HPA-4a :۰/۹۳–۱، HPA-4b :۰/۰۱–۰/۰۷ ، HPA-5a :۰/۷۹–۰/۹۹ ، HPA-5b : ۰/۰۱–۰/۱۴، HPA-15a :۰/۴۷–۰/۵۴، HPA-15b :۰/۰۴۷/۵۳ (۱۵).

در بررسی وفور ژنی محاسبه شده برای بیماران در مطالعه حاضر با محدوده‌های وفور ژن‌های پلاکتی در جمعیت‌های مختلف افراد ظاهراً سالم، مشخص شد که فراوانی به دست آمده برای آلل a برای ژن‌های HPA-1,-2,-15 کمتر از محدوده فوق است در حالی که وفور آلل b برای همین آنتی‌ژن‌ها بیشتر از محدوده فوق می‌باشد(شاید به علت این که در مطالعه ما بیماران بررسی شده‌اند) و وفور آللی سایر آلل‌ها در مطالعه ما در محدوده مطالعه‌های قبلی است. وفور ژنوتیپی و آللی بین این بیماران(ایرانی) با اهداکنندگان خون(ایرانی) در مطالعه مدنی و همکاران در جدول مقایسه شده است(۱۶)(جدول ۴).

جدول ۴: وفور ژنوتیپی و آللی بین بیماران این مطالعه با اهداکنندگان خون(۱۵)

HPA Genotypes	فراوانی نسبی ژنوتیپ در مطالعه حاضر	فراوانی ژنوتیپ در اهداکنندگان خون	فراوانی ژن در مطالعه حاضر	فراوانی ژن در مطالعه مدنی(۱۵)
HPA-1a/1a	۳۴	۹۶	۰/۶	۰/۹۸
HPA-1a/1b	۵۷/۵	۴	۰/۴	۰/۰۲
HPA-1b/1b	۸/۵	۰		
HPA-2a/2a	۸/۲	۸	۰/۴۷	۰/۵۴
HPA-2a/2b	۷۷/۶	۹۲	۰/۵۳	۰/۴۶
HPA-2b/2b	۱۴/۲	۰		
HPA-3a/3a	۵۹/۲	۱۹	۰/۷۵	۰/۴۸
HPA-3a/3b	۱۶/۳	۵۹	۰/۲۵	۰/۵۲
HPA-3b/3b	۲۴/۵	۲۲		
HPA-4a/4a	۱۰۰	۱۰۰	۱	۱
HPA-4a/4b	۰	۰	۰	۰
HPA-4b/4b	۰	۰		
HPA-5a/5a	۱۰۰	۹۸	۱	۰/۹۹
HPA-5a/5ba	۰	۰	۰	۰/۰۱
HPA-5b/5b	۰	۲		
HPA-15a/15a	۱۶/۳	۱۴	۰/۳۱	۰/۴۷
HPA-15a/15b	۲۸/۶	۱۹	۰/۶۹	۰/۵۳
HPA-15b/15b	۵۵/۱	۶۷		

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

مقایسه آماری وفور ژنوتیپی برای HPA-1b/1b ، HPA-1a/1b ، HPA-1a/1a ، HPA-2a/2b ، HPA-3a/3b و HPA-3b/3b و هم چنین وفور آلل‌های a و b برای آنتی‌ژن‌های HPA-1, -3 در بیماران مورد مطالعه با اهداکنندگان خون هم نژاد ایرانی تفاوت معناداری دارند(p< ۰/۰۰۰۱)(۱۶). در بیماران، هموزیگوسیتی برای آلل b مربوط به HPA-1,-2 مشاهده شد در حالی که اهداکنندگان فاقد آن هستند. این تفاوت وقوع احتمالی در بیماران طی دریافت پلاکت از اهداکنندگان خون هتروزیگوت ab برای این آنتی‌ژن‌ها را مطرح می‌کند. اثبات این امر احتیاج به تعیین نوع آنتی‌بادی‌های پلاکتی در بیماران دارد. در جمعیت‌های مختلف وفور آلل b برای HPA-15 در مقایسه با آلل این آنتی‌ژن بیشتر است که در مطالعه ما نیز چنین بود(۱۶). اما وفور ژنوتیپی و آللی برای سایر آنتی‌ژن‌ها تفاوت معناداری بین این دو جمعیت نشان نداد (ارزش p در محدوده ۰/۸۵-۰/۱). مقایسه وفور آللی و ژنوتیپی بیماران این مطالعه با تحقیقی که بر روی بیماران انکوهماتولوژیک با ترومبوسیتوپنی کمتر از ۲۰۰۰۰ میکرولیتر و مصرف‌کننده فرآورده متراکم پلاکتی در برزیل انجام شده نیز نشان داد که فقط در آلل‌های هموزیگوت a برای HPA-3, -15 و b برای HPA-1 با هم شبیهند و وفور ژنوتیپی و آللی سایر آنتی‌ژن‌های پلاکتی بین این دو گروه بیماران تفاوت معناداری ندارند که شاید به دلایل تفاوت نژادی باشد(۲۴). در مطالعه بررسی HPAs در ۱۵۰ بیمار (۶۵ مرد و ۸۵ زن) مبتلا به بدخیمی‌های خونی همراه با ترومبوسیتوپنی در محدوده سنی ۱۸ الی ۳۰ سال در برزیل به روش SSP-PCR وفور آللی به شرح زیر حاصل شد:

HPA-1a: 0.837; HPA-1b: 0.163; HPA-2a: 0.830; HPA-2b: 0.170; HPA-3a: 0.700; HPA-3b: 0.300; HPA-4a: 1; HPA-4b: 0; HPA-5a: 0.887; HPA-5b: 0.113; HPA-15a: 0.457 و HPA-15b: 0.543

که با وفور آلل‌های HPA-4/-5/-15 در مطالعه ما شباهت وجود داشت(۲۵).

نتیجه‌گیری

اطلاعات حاصل از مطالعه ما نشان داد که فراوانی آلل a برای HPA-1/ -3/ -4/ -5 و آلل b برای HPA-2/ -15 در جمعیت مورد مطالعه بیشتر بود. وفور آللی و ژنوتیپی بین گروه بیمار مورد مطالعه و جمعیت اهداکنندگان ایرانی می‌تواند توضیح‌دهنده وقوع مقاومت پلاکتی در آن‌ها باشد. گرچه اظهار نظر دقیق در این مورد نیاز به بررسی بیشتر اهداکنندگانی دارد که فرآورده‌های خون و پلاکت آن‌ها به این گروه بیماران تزریق شده است. تعیین ژنوتیپ آنتی‌ژن‌های پلاکتی راهکار عملی مناسبی برای بررسی علت آلوایمونیزاسیون در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی و سایر موارد ترومبوسیتوپنی و کمک به مدیریت درمان آن‌ها است و امکان انتخاب اهداکننده سازگار از نظر این آنتی‌ژن‌ها را برای بیماران مربوطه مقدور می‌سازد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از یافته‌های طرح مصوب در شورای پژوهش مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران(۷۹۶/خ مورخ ۲۷ خرداد ۱۳۹۶) با تقبل پرداخت همه هزینه‌ها توسط این مرکز می‌باشد که به عنوان پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شرق ارائه شد. نویسندگان مقاله به این وسیله از خانم‌ها: زهرا عطایی، مونا تجریشی، الهام سلطان‌آبادی، شیرین عبدی‌زاده، دکتر مهین نیکوگفتار و آقایان دکتر محمد نوروزی عقیده و مجتبی شاکرمی که در جمع‌آوری نمونه‌های مختلف برای راه‌اندازی و انجام آزمایش‌ها کمک کرده‌اند، تشکر می‌نمایند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

References:

1- Heal JM, Masel D, Rowe JM, Blumberg N. Circulating immune complexes involving the ABO system after platelet transfusion. Br J Haematol 1993; 85(3): 566-72.
2- Bub CB, Martinelli BM, Avelino TM, Gonçalez AC, Barjas-Castro Mde L, Castro V. Platelet antibody detection by flow cytometry: an effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness. Rev Bras Hematol Hemoter 2013; 35(4): 252-5.
3- 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.
4- Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. Br J Haematol 2008; 142(3): 348-60.
5- Apelseth TO, Hervig T, Bruserud O. Current practice and future directions for optimization of platelet transfusions in patients with severe therapy-induced cytopenia. Blood Rev 2011; 25(3): 113-22.
6- Kickler T. Platelet Immunology Thrombokinetiks. In: Anderson KC, Ness PM. Scientic basic of Transfusion Medicin. 2nd ed. USA: Saunders; 2000. p. 227-36.
7- Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JY, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. Blood 2002; 99(5): 1692-8.
8- Mohanty D, Kulkarni B, Ghosh K, Nair S, Khare A. Human Platelet Specific Antigens and their Importance. Indian Pediatr 2004; 41: 797-805.
9- Webert K, Chan H, Smith JW, Heddle N, Kelton J. Red cell Platelet and White cell Antigens. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM. Wintrob's Clinical Hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 808-17.
10- Kupatawintu P, Nathalang O, Charoen RO, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. Immunohematology 2005; 21(1): 5-9
11- Shaiegan M, Amiri F, Derakhti Gonbad MH, Aghaeipour M, Maghsudlu M, Tabatabaian A, et al. Flowcytometric evaluation of antibodies against histocompatibility antigens and platelet-specific antigens in patients with hematological disorders following the transfusion of platelets concentrates. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2005; 1(2): 27-36. [Article in Farsi]
12- Koutsogianni P. Nomenclature of human platelet antigens and clinical condition. Haematology 2004; 7: S82-8.
13- Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, Metcalfe P. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. Transfus Med 1997; 7(1): 41-5.
14- Ficko T, Galvani V, Rupreht R, Dovc T, Rozman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. Transfus Med 2004; 14(6): 425-32.
15- Madani T, Samiee Sh, Attaei Z, Kavari M, Mostkademin M, Shaiegan M. Platelet antigens frequency in blood donors: comparison of molecular etection with ELISA method (for HPA-1a). Sci J Iran Blood Transfus Organ 2007; 4(3): 165-74. [Article in Farsi]
16- Zimmermann R, Wittmann G, Zingsem J, Blasczyk R, Weisbach V, Eckstein R. Antibodies to private and public HLA class I epitopes in platelet recipients. Transfusion 1999; 39(7): 772-80.
17- Carolina B, Beatriz M, Avelino TM, Gonçalez A C, de Lourdes M, Barjas-Castro, *et al*. Platelet antibody detection by flow cytometry: an effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness. Rev Bras Hematol Hemoter 2013; 35(4): 252-5
18- Kuda E, Al-Wahadneh A. Comparison of Flow Panel Reactive Assay (PRA)TM Specific Test with Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) to Define the HLA Antibodies Specificity: A Preliminary Study. Saudi J Kidney Dis Transplant 2001; 12(1): 21-7.
19- Monteiro F, Rodrigues H, Kalil J, Castro MC, Panajotopoulos N, Paredes M, *et al*. Pre- and Posttransplant Monitoring of Alloantibodies by Complement-Dependent Cytotoxicity and Luminex Methodologies in Liver Transplantation. Transplant Proc 2012; 44(8): 2411-2.
20- Stanworth SJ, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness-practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. Br J Haematol 2015; 171(3): 297-305.
21- Wang J, Xia W, Deng J, Xu X, Shao Y, Ding H, *et al*. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness. Transfus Med 2018; 28(1): 40-6.
22- İnal A, Özçelik Ü, Ogan Uyanık E, Külah E, Demirağ A. Analysis of Panel Reactive Antibodies in Renal Transplant Recipients Detected by Luminex: A Single-Center Experience. Exp Clin Transplant 2016; 14(4): 401-4.
23- Arthur CM, Patel SR, Sullivan HC, Winkler AM, Tormey CA, Hendrickson JE, *et al*. CD8+ T cells mediate antibody-independent platelet clearance in mice. Blood 2016; 127(14): 1823-7.
24- Bianchi JV, de Azevedo MR, Jens E, Nukui Y, Chamone DA. Frequency of human platelet antigens in oncohematological patients with thrombocytopenia and the probability of incompatibility to platelet transfusions. Rev Bras Hematol Hemoter 2012; 34(3): 202-5.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2019; 16(2): 91-102

Original Article

Evaluation of platelet antigens and antibodies in patients with platelet refractoriness

Mostakhdemin Hosseini M.[1], Shaiegan M.[2], Samiee Sh.[2], , Mohammadi S.[3], Jalaei-Kho H.[4], Tabatabai Panah P.[1], Modarresi S.[2,5]

[1]*East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[3]*Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Tehran, Iran*
[4]*School of Medicine, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[5]*Tehran Blood Transfusion Center, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Immune platelet refractoriness is a complication of blood transfusion in patients with multiple platelet transfusions. Antibodies against surface antigens, including human platelet antigens (HPAs) and human leukocyte antigens (HLAs), can be produced which can cause the degradation of transfused platelets by macrophages. In this study, the frequency of platelet antigens and antibodies against both HPAs and HLAs is evaluated in patients with platelet refractoriness.

Materials and Methods

In this descriptive study, the simultaneous analyses of antigens of HPA-1/ -2/ -3/ -4/ -5/ -15 by molecular method (PCR-SSP), screening of platelet antibodies by flow cytometry, and anti-HLA-I antibodies by panel reactive antibody (PRA) assay were evaluated in 49 patients with platelet refractoriness.

Results

Out of 49 patients (including 18 females and 31 males) with platelet refractoriness, the platelet count in women was 6400 ± 3202 (range of 1000-10000 cells/µl) and in men 7283 ± 2518 cell/µl (range of 3000-10000) showing no significance (p = 0.055). No case of HPA-4b, HPA-5b was found in this study. Anti-HLA antibodies and anti-HPA antibodies were detected in 61.2% and 4% of the patients, respectively.

Conclusions

The data from our study showed that the frequencies of the allele a for HPA-1 / -3 / -4 / -5 and the allele b for HPA-2 / -15 were higher in the studied population. The frequencies of alleles and genotypes between the studied group and Iranian blood donors were different and can explain the occurrence of platelet resistance among the patients.

Key words: Platelets, Flow Cytometry, Antibodies, Antigens

Received: 23 Oct 2018
Accepted:12 May 2019

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: 1157-14665 Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599 ; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *mojganshaiegan@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]