

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی  
دوره ۴ شماره ۱ بهار (۸۶-۴۱)

## فعال شدن پلاکتی و تولید اینترلوکین - ۸ در فرآوردهای متراکم پلاکتی تهیه شده به روش پلاسمای غنی از پلاکت و بافی کوت

پژمان بشکار<sup>۱</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح الله<sup>۲</sup>، دکتر مژگان شایگان<sup>۳</sup>، محمدرضا آخوند<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

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

#### مواد و روش<sup>۱</sup>

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

#### یافته‌ها

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

#### نتیجه گیری

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۷/۰۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۷/۱۱/۲۱

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشکده پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس

۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی - استاد دانشکده پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۱۱

۳- ایمونولوژی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- کارشناسی ارشد آمار حیاتی - دانشگاه تربیت مدرس

**مقدمه**

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

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

**مواد و روش‌ها**

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

تهیه فرآورده‌های پلاکتی به روش PRP: واحدهای خون کامل جهت تهیه PRP-PC به روش معمول در پایگاه انتقال خون تهران، ابتدا با دور سبک(g<sub>x</sub> ۲۱۰۰) و به مدت ۴ دقیقه در دمای تنظیم شده ۲۲°C سانتریفوژ شدند که حاصل آن گلبول‌های قرمز فشرده و پلاسمای غنی از پلاکت بود. پس از انتقال پلاسمای غنی از پلاکت به یکی از کیسه‌های اقماری و باقی ماندن گلبول‌های قرمز در کیسه اولیه، کیسه حاوی گلبول قرمز جدا گردید و سپس در مرحله دوم پلاسمای غنی از پلاکت با دور بالا(g<sub>x</sub> ۴۰۰۰) و به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شد. حاصل این مرحله یک تکمه پلاکتی در ته کیسه و پلاسمای فاقد پلاکت با دارای مقدار کمی پلاکت در قسمت بالای کیسه می‌باشد که پلاسمای فاقد پلاکت به کیسه دیگری انتقال داده می‌شود و تکمه پلاکتی به همراه ۵۰ تا ۷۰ میلی‌لیتر پلاسمای باقی مانده در کیسه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و در محلی ساکن قرار داده شد تا تکمه پلاکتی به آرامی از هم جدا شود و پلاکت‌ها به صورت سوسپانسیون تک سلولی درآیند. سپس فرآورده

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

نمونه گیری از فرآوردهای پلاکتی در روزهای صفر(روز تهیه فرآورده)، روز یک(یک روز پس از تهیه فرآورده) و روز ۳ که سه روز پس از تهیه فرآورده پلاکتی می باشد انجام شد. از نمونه های کترل فقط در روزهای صفر و ۳ نمونه گیری شد.

### کترل کیفی واحدهای PC

با استفاده از دستگاه pH متر(Metrohm)، pH تمام نمونه ها در روزهای صفر، یک و سه اندازه گیری شد. شمارش پلاکت ها و گلبول های سفید و قرمز به روش دستی و توسط لام نئوبار انجام گرفت.

لوله های حاوی خون EDTA دار جهت شمارش کامل سلول های خونی توسط دستگاه سیس مکس و مقایسه تعداد پلاکت ها و تخمین میزان پلاکت های درون فرآورده متراکم پلاکتی مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور بررسی آلودگی باکتریایی فرآورده های متراکم پلاکتی، از تعدادی از واحدها به صورت راندوم در روز ۳ در شرایط استریل، کنار شعله کشت گرفته شد. جهت کشت از محیط های بلا داگار و اثوزین متیلن بلو استفاده و تا سه روز در دمای ۳۷°C قرار داده شد. تمامی واحدهای بررسی شده از نظر آلودگی باکتریایی منفی بودند.

بررسی CD62P به روش فلوسایتومتری: ابتدا تمام مواد و کیت ها به دمای اتاق رسانده شد. روش آزمایش طبق پروتکل شرکت سازنده کیت(Dako)

پلاکتی در آریتاتور در دمای ۲۲°C به مدت ۳ روز نگهداری می شود(۱۴-۱۲، ۳، ۱).

تهیه فرآورده های پلاکتی به روش BC:

خون کامل درون کیسه های چهارتایی جمع آوری شده، سپس با دور سنگین(g × ۴۰۰۰) به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شدن. در این مرحله سه لایه درون کیسه تشکیل شد. سطحی ترین لایه پلاسمای فاقد پلاکت یا دارای پلاکت اندک بود که این لایه به یکی از کیسه های اتماری انتقال داده شد. لایه میانی که لایه بافی کوت می باشد، حاوی پلاکت ها و گلبول های سفید بوده و این لایه نیز توسط دستگاه جدا کننده به کیسه دیگر منتقل گردید. البته مقداری از گلبول های قرمز هم به همراه این لایه انتقال داده شد. سپس مقداری(۵۰cc - ۷۰cc) پلاسما از کیسه حاوی پلاسمای فاقد پلاکت به کیسه حاوی لایه بافی کوت برگردانده شد. نهایتاً کیسه های گلبول های قرمز فشرده و پلاسما فاقد پلاکت (PPP) جدا شده، بافی کوت درون پلاسما به حالت سوسپانسیون در آمده و سپس مرحله دوم سانتریفوژ با دور پایین(g × ۳۶۰) به مدت ۴ دقیقه انجام شد. در پایان مایع فوقانی آن که پلاسمای غنی از پلاکت می باشد به کیسه چهارم منتقل و باقی مانده آن که گلبول های سفید به همراه مقداری RBC می باشد جدا گردیده و دور ریخته شد(۲، ۵، ۱۰-۱۶). در این روش تکمه پلاکتی ایجاد نمی گردد و لذا پس از تهیه می توان آن را درون آریتاتور ۲۲ درجه به مدت ۳ روز نگهداری نمود. یکی از اهداف این تحقیق بررسی اثر مراحل تهیه فرآورده پلاکتی بر روی فعل اشدن پلاکتی بوده است، لذا تعداد ۱۵ واحد خون کامل به عنوان فرآورده ای که هیچ گونه تغییری در پلاکت های آن اعمال نمی شود، جمع آوری گردیده و به مدت ۳ روز نگهداری شد.

### نمونه گیری از کورد:

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

نمونه‌های گرفته شده از فرآورده‌ها، از کیت الیزا(آمریکا - P-selectin) استفاده شد. اندازه‌گیری CD62P به روش ایمونوواسی، یک الیزای فاز جامد با مدت زمان ۲۵:۱ ساعت می‌باشد. اساس این آزمایش، روش ایمونوواسی ساندویچی است که یک آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی جهت CD62P در ته میکروپلیت پوشانده شده و نمونه‌ها به همراه یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی دیگر علیه CD62P کثروگه با پراکسیداز به میکروپلیت اضافه می‌شود. پس از برداشتن آنتی‌بادی‌های کثروگه باند نشده طی سه مرحله شستشو، سوبسترای مناسب اضافه شده که رنگ ایجاد شده متناسب با غاظت P در نمونه می‌باشد(۱۶-۲۰، ۱۲).

جهت تجزیه و تحلیل نتایج از آزمون‌های زیر استفاده شد:

- آزمون فریدمن جهت مقایسه و وجود تفاوت معنی‌دار بین روزها(به دلیل همبستگی بین مشاهدات)
- آزمون کروسکال والیس جهت مقایسه گروه‌ها در هر روز
- آزمون منویتنی جهت مقایسه دو گروه در هر روز(مقایسه PRP و BC)
- آزمون ویلکاکسون رتبه علامت‌دار جهت مقایسه دو روز برای هر گروه(مثلاً PRP در روز یک و سه)
- ضریب همبستگی اسپیرمن جهت بررسی ارتباط بین دو متغیر(ارتباط بین IL-8 و شمارش گلبول‌های سفید در PRP)

#### یافته‌ها

در نتایج به دست آمده از مراحل کنترل کیفی واحدهای پلاکتی مشخص گردید که شمارش پلاکتی واحدهای قابل ملاحظه‌ای ندارند و تنها در PRP-PC کمی بیشتر از BC-PC است. استاندارد شمارش پلاکتی در یک واحد،  $10 \times 10^{-4}$  می‌باشد. نتایج شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید و میزان pH در جدول شماره ۱ ذکر شده است. مقایسه میان شمارش پلاکتی واحدهای پلاکتی با میزان پلاکت‌های موجود در یک واحد خون کنترل در روز صفر و نیز نمونه‌های CBC هر واحد مشخص می‌کند که تقریباً ۸۵ تا ۹۰ درصد پلاکت‌های موجود در یک واحد

انجام گرفت، ۱۰ میکرولیتر از نمونه را با ۹۹۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی(PBS) مخلوط کرده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه حاصل را درون لوله‌های پلاستیکی ریخته و ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کونژوگه با PE(فایکواریتین)، به آن افزوده شد. سپس به مدت نیم ساعت در دمای ۴۰°C و تاریکی قرار داده شد. در پایان مقدار ۱۰۰ میکرولیتر پارافرمالدئید جهت فیکس کردن سلول‌ها به آن افزوده و توسط دستگاه(پارتک، PAS3) شمارش گردید(۱۲-۲۰، ۱۶، ۱۸).

بررسی فلوسایتومتری CD14 در سطح سلول‌های موجود در فرآورده‌های پلاکتی:

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

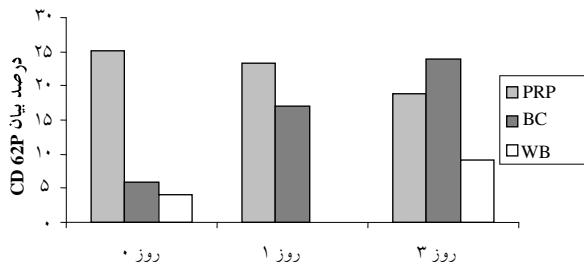
اندازه‌گیری IL-8 محلول در پلاسمای:

برای سنجش کمی-IL-8 از کیت ایترلوکین ۸ انسانی(روش) و روش الیزا استفاده شد که کمترین مقدار قابل ریدابی آن  $6/2 \text{ pg/ml}$  بود. ایترلوکین ۸ انسانی یک Enzyme - Linked Immunosorbant روش ارزیابی کمی IL-8 انسانی در شرایط *in vitro* در سرم، مایع مغزی نخاعی و کشت سلول استفاده می‌شود.

اندازه‌گیری CD62P محلول به روش الیزا:

جهت اندازه‌گیری مقدار CD62P محلول انسانی در

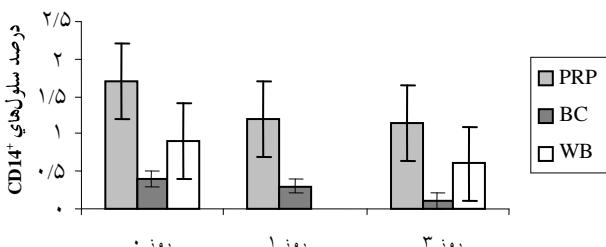
گروه کنترل مشهود است ( $p=0.001$ ). در شکل شماره ۱ CD62P سطح پلاکت‌ها در هر سه گروه مقایسه شده‌اند.



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

در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP در روز صفر، ۱/۷ درصد سلول‌های شمارش شده توسط دستگاه فلوسایتو‌متری از نظر  $CD_{14}$  مثبت بودند که احتمالاً منوسيت می‌باشند. اين ميزان در روز سه به ۱/۲ درصد رسیده است و اين اختلاف با  $p=0.06$  معنی دار می‌باشد. در BC-PC، ميزان اين سلول‌ها در روز صفر ۰/۴ درصد و در روز سه ۰/۱۱ درصد بودند ( $p=0.001$ ). اين ميزان در خون كامل در روز صفر ۰/۹ درصد و در روز سه، ۰/۶ درصد بود. ارتباط قابل ملاحظه‌اي بين نتایج حاصل از فلوسایتو‌متری با نتایج حاصل از شمارش افتراقي در تعداد منوسيت‌ها وجود دارد و می‌توان نتيجه گرفت که ميزان منوسيت‌ها در BC-PC بسیار كمتر از مقدار آن در PRP-PC است، هم چنین در روز صفر، اختلاف آماری بين دو گروه PRP و BC-PC وجود دارد ( $p=0.001$ ). در شکل شماره ۲ سلول‌های  $CD_{14}$  مثبت در سطح پلاکت‌ها در هر سه گروه نشان داده شده‌اند.

غایظت  $CD62P$  محلول در روز صفر در هر سه گروه  $CD62P$  تفاوت معنی داري ندارد. نتایج مربوط به مقدار



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

جدول شماره ۱: ميانگين ( $\pm SD$ ) شمارش پلاکت و گلوبول‌های سفيد و ميزان pH در فرآورده‌های پلاکتی

	PRP	BC	WB
PLT $\times 10^11/\text{Unit}$	۷/۲ ± ۲/۱	۶/۵ ± ۱/۸	۷/۲۹ ± ۱/۷
WBC $\times 10^9/\text{Unit}$	۰/۵۲ ± ۰/۳۳	۰/۱۱ ± ۰/۲۳	۲/۶ ± ۰/۵۸
pH روز سه	۷/۱۳ ± ۰/۱۳	۷/۰۶ ± ۰/۱۹	۷/۱۷ ± ۰/۱۴

خون كامل، در يك واحد پلاکتی جمع آوري شده‌اند. طبق استانداردهای اروپايي شمارش قابل قبول گلوبول‌های سفيد در واحدهای پلاکتی باید در محدوده  $1 \times 10^9 - 4 \times 10^9$  و ميزان pH بين ۶/۴ تا ۷/۴ باشد (۱-۲).

جهت شمارش افتراقي از رسوب فرآورده‌ها گسترش تهيه شد و پس از فيكس شدن، توسط گيمسا رنگ آميزي شدند. نتایج نشان دادند که ۸۰ درصد گلوبول‌های سفيد را لنفوسيت و مابقى را نوتروفيل‌ها تشکيل می‌دهند. درصد بسيار کمي نيز منوسيت‌ها می‌باشند. اين يافته نيز با ميزان سلول‌های  $CD14$  مثبت که توسط فلوسيتو‌متری ارزیابي شد، تطابق داشت.

pH تمامی واحدهای پلاکتی مورد مطالعه و نمونه‌های كنترل از نظر كيفيت پلاکت توليد شده وضعیت مطلوبی داشتند و pH آنها در محدوده  $0.3 \pm 0.2$  بود.

بيان سطحي  $CD62P$  در پلاکت‌های حاصل از روش PRP در روزهای صفر، يك و سه به ترتيب  $25/2$ ،  $23/4$ ،  $18/8$  درصد می‌باشد که اين اختلاف معنی دار است ( $p=0.04$ ). اما اين مقدار در پلاکت‌های تهيه شده به روش BC در روز صفر  $5/8$  درصد و در روز يك  $17/1$  در روز سه،  $22/3$  درصد می‌باشد. ميزان پلاکت‌های فعال شده در نمونه‌های كنترل در روز صفر  $4/1$  درصد و در روز سه  $9/2$  درصد است. هم چنین بين دو گروه BC-PRP-PC و PC در روز صفر اختلاف وجود دارد ( $p=0.001$ ). اما در روز سه ذخيره سازی، تفاوتی در ميزان پلاکت‌های فعال شده در دو گروه وجود ندارد. در مقایسه گروه BC-PC با گروه كنترل در روز صفر، تفاوت معنی داري وجود ندارد، در صورتی که اين اختلاف در مقایسه گروه PRP-PC با

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

sCD62P \ گروه	PRP	BC	WB	P value BC , PRP	P value WB, PRP	P value WB , BC
روز صفر (mean $\pm$ SD)	۸۶/۸ $\pm$ ۲۱/۵	۸۸/۳ $\pm$ ۴۴/۲	۶۴/۷ $\pm$ ۲۵	.۰/۷	.۰/۰۶	.۰/۱
روز یک (mean $\pm$ SD)	۹۹/۵ $\pm$ ۳۵/۵	۲۲۶/۸ $\pm$ ۱۱۶/۱	*	.۰/۰۰۱	*	*
روز سه (mean $\pm$ SD)	۱۱۱/۴ $\pm$ ۲۲/۶	۳۰۱/۳ $\pm$ ۱۰۰/۹	۹۲/۱ $\pm$ ۲۸/۹	.۰/۰۰۰۱	.۰/۲	.۰/۰۰۰۱
مقایسه روز صفر و سه P value	.۰/۰۰۹	.۰/۰۰۱	.۰/۰۰۸	*	*	*
مقایسه روز یک و سه P value	.۰/۰۹	.۰/۰۴	*	*	*	*

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

IL-8 \ گروه	PRP	BC	WB	P value BC , PRP	P value WB, PRP	P value WB , BC
روز صفر (mean $\pm$ SD)	۲۳/۴ $\pm$ ۸/۷	۱۳/۸ $\pm$ ۶/۱	۸/۵ $\pm$ ۷/۴	.۰/۰۰۳	.۰/۰۰۰۱	.۰/۰۱
روز یک (mean $\pm$ SD)	۴۷/۱ $\pm$ ۴۱/۷	۲۴/۳ $\pm$ ۱۰/۹	*	.۰/۰۶	*	*
روز سه (mean $\pm$ SD)	۱۲۶/۶ $\pm$ ۲۳۷/۶	۳۸/۸ $\pm$ ۱۹/۶	۱۴/۲ $\pm$ ۵/۵	.۰/۲	.۰/۰۰۰۱	.۰/۰۰۰۱
مقایسه روز صفر و سه P value	.۰/۰۰۱	.۰/۰۰۱	.۰/۰۰۲	*	*	*
مقایسه روز یک و سه P value	.۰/۰۰۹	.۰/۰۰۰۳	*	*	*	*

احتمالاً در عمل در بدن فاقد کارآیی لازم می‌باشد ( $p < 0.05$ ). هم چنین در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP تعداد گلبول‌های سفید بسیار بیشتر بودند، لذا ایترلوکین - ۸ که منبع عمده ترشح آن گلبول‌های سفید و به خصوص منوستیت‌ها می‌باشند، در این فرآورده‌ها در سطح بالاتری قرار داشت ( $p < 0.05$ ). پس از تهیه فرآورده‌ها از روز یک به بعد درصد پلاکت‌های فعال در PRP-PCs کمتر شده است، در صورتی که درصد پلاکت‌های فعال در پلاکت‌های تهیه شده به روش بافی کوت از روز صفر به بعد رو به افزایش بوده است.

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

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

محلول در هر سه گروه در روزهای صفر، یک و سه سه در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که غلظت CD62P محلول در هر سه گروه طی نگهداری افزایش نشان داده‌اند و بیشترین میزان افزایش در گروه BC مشاهده شده است. تفاوتی بین PRP-PC و گروه کنترل وجود ندارد ( $p = 0.2$ )، اما تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین گروه BC-PC و گروه کنترل وجود دارد ( $p = 0.0001$ ).

غلظت IL-8 در روز صفر در PRP-PCs در مقایسه با روش BC به صورت معنی داری کمتر می‌باشد ( $p = 0.003$ ). غلظت IL-8 در هر سه گروه در روزهای مختلف در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. نتایج نشان دادند که غلظت IL-8 در هر سه گروه افزایش معنی داری داشته است و بیشترین میزان افزایش مربوط به گروه PRP بوده است.

## بحث

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

چنین غلظت CD62P محلول در فرآوردهای تهیه شده به روش بافی کوت در روزهای صفر، یک و سه به ترتیب  $14/7 \pm 4/1$  و  $22/9 \pm 4/8$  و  $64/2 \pm 11/1$  بود (۲۵).

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

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

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

استاک و همکارانش در سال ۱۹۹۳ طی یک تحقیق، غلظت سیتوکین‌ها را مورد ارزیابی قرار داده و گزارش نمودند که در PRP-PC غلظت ایترلوکین - ۸ در روز دوم نگهداری ۱۱۶ و در روز سه ۱۲۹۰ می‌باشد. ایشان ذکر کردند که ارتباط مستقیمی بین شمارش گلبول‌های سفید و تجمع سیتوکین‌ها مثل ایترلوکین - ۸ در فرآوردهای پلاکتی وجود دارد که این یافته‌ها با یافته‌های مانیز تطابق دارد ( $r=0.2$ ،  $p<0.05$ ) (۳۰).

## نتیجه‌گیری

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

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

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

مورنی و همکاران اظهار داشتند سانتریفوژ با دور سنگین و چسبیدن پلاکت‌ها در روند تهیه پلاکت به روش PRP، باعث فعال شدن و یا صدمه زدن به پلاکت‌ها و آزاد شدن محتويات گرانولی آن‌ها مثل CD62P و  $\beta$ -ترومبوگلبولین می‌شود (۲۲).

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

لوزانو در سال ۱۹۹۹ دو روش PRP و بافی کوت را مقایسه نموده و گزارش کرد که در روش BC در روز صفر یک دوم پلاکت‌ها، CD62P را در سطح خود بیان می‌نمایند و در روش PRP در روز صفر ۲۴ درصد آن‌ها CD62P را بیان می‌کنند. این مقدار در روز سوم به  $12/9$  درصد می‌رسد که این کاهش به دلیل برگشت پلاکت‌ها به فاز استراحت (ریکاوری) می‌باشد. در صورتی که در روش بافی کوت درصد بیان سطحی CD62P در روز صفر ۲/۱ درصد و در روز یک ۹ درصد می‌باشد، ایشان نیز ذکر نمودند که درصد پلاکت‌های CD62P مثبت در روز سه در هر دو روش یکسان است (۲۱).

فرابتی و همکاران و شاتیل و همکاران نیز افزایش میزان CD62P محلول را در PRP-PCs از روزهای ۲ تا روز ۵ نگهداری گزارش نمودند (۲۴). طی تحقیقی که در سال ۲۰۰۲ توسط بوک و همکاران صورت گرفت، شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید در BC-PCs، به ترتیب  $10^{11} \pm 10^{10}$  و  $10^7 \pm 10^8$  و  $10^4 \pm 10^3$  گزارش شد. هم

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

در استفاده این فرآورده کمتر اتفاق خواهد افتاد.

### تشکر و قدردانی

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

### References:

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

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

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

***Beshkar P.<sup>1</sup>(MS), Pourfathollah A.A.<sup>1</sup>(PhD), Shaiegan M.<sup>2</sup>(PhD), Akhound M.R.<sup>1</sup>(MS)***

<sup>1</sup>*Tarbiat Modares University*

<sup>2</sup>*Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center*

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

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

#### **Materials and Methods**

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

#### **Results**

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

#### **Conclusions**

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

**Key words:** Platelet, Platelet rich plasma, CD62P, IL-8, CD14.

*SJIBTO 2007; 4(1): 41-50*

*Received: 11 July 2006*

*Accepted: 17 Feb. 2007*

---

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