خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۴ شماره ۳ پاییز ۸۶ (۲۱۳-۲۰۵)

ارزیابی *in vitro* بیان P-Selectin و تجمع پلاکتی در پلاکت متراکم ذخیره شده

دکتر آزاده صدری[۱]، دکتر احمد قره‌باغیان[۲]، دکتر شهرام وائلی[۳]، دکتر فریبا عسگری‌پور[۳]، دکتر مهدی کرباسی‌زاده[۳]، دکتر ژولیت قالدی[۳]، دکتر مهناز آقایی‌پور[۴]، طاهره شعشعانی[۵]، اعظم‌السادات طباطبایان[۵]، فاطمه کامی[۶]، دکتر مینو احمدی‌نژاد[۷]

چکیده

سابقه و هدف

پلاکت‌ها نقش مهمی در هموستاز به عهده دارند. از پلاکت متراکم در موارد ترومبوسیتوپنی و اختلال عملکرد پلاکت‌ها استفاده می‌شود. از آن جایی که مطالعات پیشین نشان داده‌اند که فعال شدن پلاکت‌ها در واحدهای پلاکت متراکم از عملکرد مناسب آن‌ها می‌کاهد، در این مطالعه برای ارزیابی فعالیت پلاکت‌ها در طی تهیه و نگهداری، میزان بیان سطحی P-Selectin ، آزمایش تجمع پلاکتی و میزان pH مورد بررسی قرار گرفت.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی مقطعی بود و تعداد ۱۰۰ نمونه از پلاکت‌های متراکم تهیه شده در پایگاه تهران به صورت تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد ۳۴ واحد مربوط به روز اول، ۳۳ واحد مربوط به روز دوم و ۳۳ مورد مربوط به روز سوم تهیه بود. برای هر واحد میزان بیان سطحی P-Selectin(CD62p) با استفاده از روش فلوسیتومتری و هم چنین میزان pH و آزمایش تجمع پلاکتی با استفاده از دو آگونیست آراشیدونیک اسید و ریستوستین مورد بررسی قرار گرفت. پس از به دست آمدن نتایج، تحلیل آماری به وسیله آزمون Anova با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۱/۵ انجام شد.

یافته‌ها

در طی روز اول تا سوم میزان pH افزایش معنی‌داری یافته بود(۰/۳۵ ± ۶/۷۷ در روز اول و ۰/۳۰ ± ۷/۳۰ در روز سوم)(p< ۰/۰۵). میزان بیان سطحی P-Selestin در روز سوم نسبت به روز اول افزایش معنی‌داری یافته بود(۹/۲ ± ۲۲/۵۶ در روز اول نسبت به ۱۲/۷۴ ± ۳۳/۰۴ در روز سوم)(p< ۰/۰۵). میزان تجمع پلاکتی با استفاده از دو آگونیست آراشیدونیک اسید و ریستوستین در روز سوم نسبت به روز اول کاهش معنی‌داری نشان داد(p< ۰/۰۵).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان‌دهنده این است که پلاکت‌ها در طی نگهداری فعال می‌شوند و در اثر گذشت زمان بیان سطحی P-Selectin در پلاکت‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین از این شاخص می‌توان برای بررسی *in vitro* کارایی فعالیت پلاکت متراکم استفاده کرد.

کلمات کلیدی: **پلاکت، P-Selectin ، فلوسیتومتری، تجمع پلاکتی**

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش: ۸۶/ ۶/۱۴

۱ـ دکترای علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳ـ دکترای علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴ـ متخصص آسیب‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵ـ کارشناس بیولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶ـ کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷- متخصص آسیب شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

مقدمه

نقش پلاکت‌ها در هموستاز به خوبی شناخته شده است(۱). این سلول‌ها کوچک، دیسکوئید با قطری حدود ۴-۲ میکرون و متوسط حجم ۱۱-۷ فمتولیترمی‌باشند و مقدار طبیعی آن‌ها $۱۰^{۹}$ × ۴۰۰-۵۰ می‌باشد. پلاکت‌ها فاقد هسته بوده و از مگا کاریوسیت‌های مغز استخوان مشتق می‌شوند. طول عمر آن‌ها در خون ۱۰ روز است ولی به دنبال آسیب به دیواره عروق، فعال می‌شوند و این امر باعث می‌شود که پلاک عروقی به سرعت تشکیل شود تا محل آسیب را محدود نماید، به همین دلیل پروتئین‌ها و رسپتورهای سطح پلاکت‌ها زیاد می‌شوند تا پاسخ مؤثر به آسیب عروقی داده شود. آندوتلیوم عروق طبیعی، مهار کننده‌های پلاکتی مانند اکسیدنیتریک، پروستاسیکلین و ADPase(CD39) تولید می‌کنند ولی وقتی که آسیب به دیواره عروق وارد می‌گردد، ترکیبات زیرآندوتلیوم در معرض پلاکت‌ها قرار می‌گیرند و آن‌ها را فعال می‌کنند، در نتیجه تجمع پلاکتی و نهایتاً لخته ایجاد می‌شود. تغییراتی که در نتیجه نگهداری پلاکت متراکم ایجاد می‌شود شامل بیان گلیکوپروتئین‌ها(gpIb ، IIb/IIIa) و تولید مارکرهای فعالیت پلاکت(CD40L و CD63 و CD62P و کمپلکس پلاکت ـــ لکوسیت)، بیان فسفولیپیدهای با شارژ منفی و تشکیل میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت (platelet-derived microparticles) می‌باشند(۲). یکی از این مارکرها، گلیکوپروتئین P-Selectin از اعضای خانواده لکتین از نوع C- type lectin و از ملکول‌های چسبنده است(۳). اسامی دیگر P-Selectin شامل: GMP-140, CD62P, PADGEM است(۴، ۳). این مولکول در حالت طبیعی، در گرانول‌های ترشحی یا گرانول‌های آلفای پلاکت و نیز در اعضای ویبل ـ پالاد سلول‌های آندوتلیال وجود دارد و تحت تاثیر محرک‌ها، از محل ذخیره خود خارج و به سرعت به سطح سلول آندوتلیال و پلاکت‌ها منتقل می‌شود(۶، ۵). عملکرد اصلی پلاکت‌ها، توقف خونریزی می‌باشد. این امر در پاسخ به آگونیست‌های مختلف مانند ترومبین کلاژن که به دلیل آسیب به دیواره عروق آزاد می‌شوند، اتفاق می‌افتد و در نهایت به وسیله تشکیل انبوه پلاکتی و شروع فعالیت فاکتورهای انعقادی، فیبرین تشکیل می‌گردد. در طی این فرآیند، پروتئین‌های غشایی گرانول مثل CD62P و CD63 از طریق سیستم کانالیکولی باز شده و به وسیله اتصال گرانول‌ها به غشای خارجی، بر روی سطح غشای پلاکت‌ها بیان می‌شود. از این رو P-Selectin را جزو گروه اپی‌توپ‌های جدید (Neoepitopes) قرار داده‌اند که پارامتر بسیار حساسی برای بررسی فعال شدن پلاکت‌ها است(۴). با توجه به این که برای جلوگیری از خونریزی در بیماران ترومبوسیتوپنیک و هم چنین افراد دچار نقص فعالیت پلاکتی از تزریق پلاکت متراکم استفاده می‌شود، بنابراین فعالیت و کارایی این محصول اهمیت بسیار زیادی دارد(۷). کنترل کیفی این فرآورده یکی از موارد مهمی است که در سازمان‌های انتقال خون دنیا توجه زیادی را به خود جلب کرده است و فعالیت‌های زیادی در جهت بالا بردن حساسیت آزمون‌های کیفیت فرآورده‌های خونی به ویژه پلاکت به انجام رسیده است تا بتوان از کم شدن کیفیت محصول پلاکتی جلوگیری کرد(۹، ۸). از فاکتورهایی که می‌توان جهت بررسی فعال شدن پلاکت‌ها مورد بررسی قرار داد، بیان P-Selectin و هم چنین آزمایش تجمع پلاکتی در پاسخ به آگونیست‌های مختلف می‌باشد(۱۰). مدت نگهداری نیز در میزان فعالیت پلاکت‌ها مؤثر است(۱۳-۱۱). با توجه به این موضوع که در کشور ما پلاکت به روش PRP یا پلاسمای غنی از پلاکت تهیه می‌شود، در این تحقیق برای بررسی کیفیت پلاکت‌های تهیه شده در سازمان، میزان فعالیت P-Selectin ، تغییرات pH و تجمع پلاکتی در طی سه روز اول تهیه پلاکت، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی مقطعی و جامعه مورد مطالعه کیسه‌های پلاکت متراکم تهیه شده در پایگاه انتقال خون تهران بودند. روش نمونه‌گیری تصادفی بود. قبل از نمونه‌گیری از تمام اهداکنندگان جهت مصرف فرآورده‌های خونی آنان در امر تحقیق اجازه گرفته شد. از این تعداد ۳۴ کیسه مربوط به روز اول تهیه، ۳۳ عدد مربوط به روز دوم و ۳۳ عدد مربوط به روز سوم بود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

پلاکت‌ها پس از تهیه، از پایگاه تهران به آزمایشگاه هماتولوژی ستاد مرکزی ارسال می‌شد که پس از تحویل، مشخصات هر کیسه که شامل شماره کیسه، نام و نام خانوادگی اهداکننده، تاریخ تهیه و تاریخ آزمایش بود در دفتر مخصوص ثبت می‌گردید. سپس محتویات هر کیسه به ۳ قسمت مساوی تقسیم می‌شد. یک قسمت از آن برای انجام آزمایش pH مورد بررسی قرار می‌گرفت، یک قسمت به بخش فلوسیتومتری و یک قسمت به بخش انعقاد منتقل می‌شد.

اندازه‌گیری pH:

برای این امر از pH متر METLER DELTA 345 استفاده شد. به طوری که ابتدا دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه روشن شده تا دمای کالیبراسیون آن به دمای آزمایشگاه برسد. سپس با کالیبراتورهای pH=۴ و pH=۷ ، دستگاه را کالیبره کرده و pH نمونه‌ها اندازه‌گیری می‌شد.

فلوسیتومتری:

در این بخش در ابتدا روی ۰/۵ میلی‌لیتر از پلاکت متراکم، ۲ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پارافرمالدئید افزوده شد تا پلاکت‌ها فیکس گردند(۱ حجم پلاکت و ۴ حجم فیکساتیو). مخلوط پلاکت و فیکساتیو ۱۵ دقیقه در یخچال نگهداری شد تا عمل فیکساسیون کامل شود. سپس مخلوط فوق ۲ مرتبه توسط بافر فسفات مخصوص در ۳۰۰۰ گرم شسته شد(برای تهیه بافر فسفات مخصوص، ۲۴۵ میلی‌گرم پودر KH_2PO_4 ، ۷۱۰ میلی‌گرم پودر Na_2HPO_4 ، ۲۴۷ میلی‌گرم پودر KCL ، ۹/۹۵ گرم پودر NaCl و ۱/۶۷۵ گرم پودر EDTA را توزین نموده در یک بالون ژوژه یک لیتری می‌ریزیم. سپس کمی آب مقطر به آن اضافه کرده و حجم کلی محلول به ۱ لیتر رسانده می‌شود. pH باید روی ۷/۲ تنظیم باشد. بعد از مرحله شستشو، مایع‌رویی دور ریخته شده و رسوب پلاکت‌ها در ۰/۵ سی‌سی بافر فسفاتی مخصوص شناور گردید. سپس در سه لوله آزمایش هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پلاکتی فوق افزوده شد. به لوله اول ۱۰ میکرولیتر محلول آنتی‌بادی(x0949Dako) و کنترل وایزوتایپ منفی و به لوله دوم ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی CD61(F0803 Dako) که برای پلاکت‌ها اختصاصی است و به جهت تعیین جمعیت سلولی از این مارکر به عنوان شناساگر استفاده می‌شود، افزوده شد. به لوله سوم آنتی‌بادی CD62P(R7200DAKO) افزوده شد و اجازه داده شد تا محلول‌ها ۳۰ دقیقه در یخچال انکوبه شوند. سپس با استفاده از محلول‌های آماده‌سازی دستگاه فلوسیتومتری گلبول‌های قرمز موجود را لیز کرده و حجم محلول پلاکت به حدود ۱/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. توسط دستگاه فلوسیتومتری پورتک، میزان بیان آنتی‌ژن‌های CD61 و CD62p بر روی سطح پلاکت‌ها اندازه‌گیری شد و نتایج به صورت درصد پلاکت گزارش گردید.

آزمایش تجمع پلاکتی:

در بخش انعقاد هر نمونه در دو لوله پلاستیکی ریخته شد. یک لوله جهت تهیه PPP (Plasma Poor Platelet) و یک لوله جهت شمارش پلاکت‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه PPP لوله اول به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵۰۰ گرم سانتریفوژ شده و سپس محلول رویی برداشته شد. شمارش پلاکتی روی محتویات لوله دوم انجام شد(۱۰۰۰- سیس‌مکس). تعداد پلاکت‌ها با PPP مربوط به هر نمونه به تعداد ۰۰۰، ۴۰۰-۰۰۰، ۳۰۰ در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. سپس آزمایش تجمع پلاکتی روی هر کدام از نمونه‌ها با استفاده از آگونیست‌های ریستوستین و آراشیدونیک اسید از نظر عملکرد پلاکتی با دستگاه(Aggregometer Helena Paks-4) انجام شد. نتایج به صورت درصد تجمع پلاکتی ثبت گردید.

برای تحلیل داده‌ها از برنامه نرم‌افزاری SPSS۱۱/۵ استفاده شد. برای مقادیر خام به دست آمده در هر گروه میانگین و انحراف معیار محاسبه شد و برای مشخص کردن منشا تفاوت احتمالی بین سه گروه، از Post hoc آزمایش Anova با روش Bonferroni استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین پارامترهای مورد بررسی در روزهای مختلف از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. فاصله اطمینان به کار رفته در تجزیه و تحلیل آزمایش‌ها در محدوده ۹۵٪ بود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

یافته ها

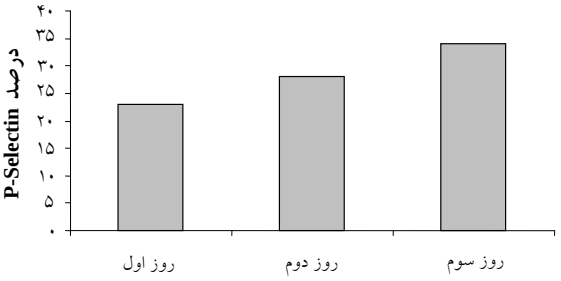
نتایج به دست آمده در جدول ۱ خلاصه شده است:

جدول ۱: تغییرات میزان pH، درصد P-Selectin و آزمایش تجمع پلاکتی در سه روز نگهداری

	زمان ذخیره (روزها)		
	۱(n=۳۴)	۲(n=۳۳)	۳(n=۳۳)
pH	۶/۷۷ ± ۰/۳۵	۷/۲۵ ± ۰/۱۹	۷/۳۰ ± ۰/۳۰
P-Selectin(%)	۲۲/۵۶ ± ۹/۲	۲۶/۰۸ ± ۱۳/۰۹	۳۳/۰۴ ± ۱۲/۷۴
درصد تجمع پلاکت (آراشیدونیک اسید)	۶۸/۵۹ ± ۳۱/۵۵	۴۶/۶۸ ± ۳۲/۵۳	۴۳/۵۲ ± ۲۹/۰۹
درصد تجمع پلاکت(ریستوستین)	۸۳/۸۶ ± ۷/۴۴	۷۱/۵۲ ± ۱۱/۳۲	۶۶/۶۰ ± ۲۲/۷۵

همان‌طور که در جدول فوق مشاهده می‌شود، بین میانگین مقادیر pH در روز اول و دوم و روز اول و سوم تفاوت معنی‌دار مشاهده می‌شود($p< ۰/۰۵$).

هم چنین بین میانگین مقادیر CD62P بین روز اول و سوم تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود($p< ۰/۰۵$)(نمودار ۱).



نمودار شماره ۱: تغییرات P-Selectin در طی مدت نگهداری

بین میانگین مقادیر تجمع پلاکتی با استفاده از آگونیست آراشیدونیک اسید در روز اول و سوم تفاوت معنی‌داری موجود بود($p< ۰/۰۵$). بین میانگین مقادیر تجمع پلاکتی با استفاده از آگونیست ریستوستین در روز اول و سوم تفاوت معنی‌دار موجود بود($p< ۰/۰۵$). ارتباط بین مقادیر pH و آزمایش تجمع پلاکتی با آگونیست آراشیدونیک اسید در روز اول و دوم و سوم به صورت معکوس برآورد شد(به ترتیب۰/۴۹- و۰/۴۳- و۰/۴۱- =r) ($p< ۰/۰۵$).

ارتباط بین مقادیر pH و آزمایش تجمع پلاکتی با آگونیست ریستوستین در روز اول و دوم و سوم به صورت معکوس برآورد شد(به ترتیب ۰/۴۵- و ۰/۴۶- و ۰/۴۴- =r)($p< ۰/۰۵$).

ارتباط بین مقادیر pH و میزان بیان P-Selectin در روز اول و دوم و سوم به صورت مستقیم برآورد شد(به ترتیب ۰/۴۳ و ۰ و ۰/۳۹ و ۰/۴۵ =r)($p< ۰/۰۵$).

ارتباط بین مقادیر میزان بیان P-Selectin و آزمایش تجمع پلاکتی با آگونیست آراشیدونیک اسید در روز اول و دوم و سوم به صورت معکوس و نسبتاً خوب برآورد شد(به ترتیب ۰/۴۴- و ۰/۵۰- و ۰/۴۸- =r)($p< ۰/۰۵$).

بحث

با توجه به این که پلاکت فرآورده‌ای است که جهت جلوگیری از خونریزی برای بیماران تجویز می‌شود، کنترل کیفیت آن جهت کارآیی مناسب در *in vivo* توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. پلاکت‌ها در طی تهیه و نگهداری دچار تغییرات مرفولوژیک و متابولیک می‌شوند که این تغییرات در مجموع اثرات نامطلوبی روی ساختمان و فعالیت آن‌ها دارد و در نهایت به کاهش بازیافت پلاکتی پس از تزریق می‌انجامد. فعالیت پلاکت‌ها پس از تزریق به کیفیت آن‌ها بستگی دارد. یکی از موارد مؤثر بر روی کیفیت این فرآورده، روش تولید و مدت نگهداری پلاکت‌های متراکم است(۱۲، ۱۱، ۴). به همین دلیل نیاز است که روش حساس و مناسبی جهت کنترل کیفیت این فرآورده مورد استفاده قرار گیرد. از مهم‌ترین تغییرات ایجاد شده در پلاکت‌های متراکم، فعال شدن آن‌ها می‌باشد که باعث تغییر در عملکرد و حیات پلاکت‌ها می‌شود(۱۵، ۱۴).

یکی از پارامترهای حساسی که به وسیله آن می‌توان فعالیت پلاکت‌ها را ارزیابی کرد، میزان بیان CD62P (P-Selectin) است(۱۱). از روش‌های حساس برای بررسی میزان بیان CD62P ، فلوسیتومتری است که دارای حساسیت و اختصاصیت مناسب است(۱۶، ۱۰). از دیگر آزمایش‌های بسیار حساس در بررسی فعالیت پلاکت‌ها

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

آزمایش تجمع پلاکتی می‌باشد(۱). با توجه به این موارد، هدف این پژوهش بررسی تغییرات بیوشیمیایی پلاکت‌های متراکم طی ۳ روز اول نگهداری بود که در همین راستا از پارامترهای CD62P و پاسخ به آگونیست‌های ریستوستین و آراشیدونیک اسید برای ارزیابی فعال شدن پلاکت‌ها استفاده شد. در مطالعه ما میزان پایه بیان P-Selectin ، در روز اول ۹/۵۲ ± ۲۲/۵۶ درصد برآورد شد و در روزهای دوم و سوم افزایش معنی‌داری یافت($p< ۰/۰۵$). طبق استانداردهای جهانی مورد قبول، مقدار رفرانس برای pH در روز اول تهیه بیشتر از ۶/۲ و برای P-Selectin در روز اول ۱۰٪ تا ۲۰٪ می‌باشد(۱۷).

یافته‌های پژوهش ما حاکی از کاهش تجمع پلاکتی در پاسخ به آگونیست آراشیدونیک اسید و ریستوستین، افزایش میزان بیان P-Selectin و افزایش pH طی نگهداری می‌باشد.

در دهه‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری در زمینه بررسی و بهبود فعالیت پلاکت‌ها انجام شده است. در پژوهش مشابهی که در سال ۱۹۹۰ توسط فیجنر و همکاران و در سال ۱۹۹۲ توسط رینـدر و همکاران انجام شد، بیان سطحی P-Selectin برای بررسی فعالیت پلاکت‌های متراکم مورد آزمایش قرار گرفت. در این پژوهش‌ها از پلاسمای خود فرد جهت تعلیق پلاکت‌ها استفاده شد. این پژوهش‌ها نشان داد که میزان بیان P-Selectin در روز پنجم تهیه نسبت به روز اول افزایش می‌یابد، در نتیجه پلاکت‌ها طی نگهداری فعال و دچار آسیب می‌شوند. بنا به عقیده محققین پژوهش، این امر می‌تواند به دنبال تعلیق مجدد پلاکت‌ها پس از جداسازی از خون کامل در روش PRP باشد که نقش مهمی را در فعال‌سازی پلاکت‌ها ایفا می‌کند(۱۹، ۱۸). نتایج این مطالعه مشابه با نتایج حاصل از پژوهش ما بوده است.

در مطالعه مشابهی که در سال ۱۹۹۳ توسط رینـدر و همکاران انجام شد، به بررسی دگرانولاسیون آلفای پلاکتی با استفاده از بیان سطحی P-Selectin و اندازه‌گیری گلیکوپروتئین IIb/IIIa در پلاکت‌های متراکم پرداختند. نتایج این بررسی نشان داد که:

۱- فلوسیتومتری برای اندازه‌گیری بیان سطحی P-Selectin جهت نشان دادن فعال شدن پلاکت‌ها روش حساسی می‌باشد.

۲- بیان تام P-Selectin با آزادسازی بتاترومبوگلوبولین مرتبط است که این نشانگر وسعت آزاد شدن محتویات گرانول‌های آلفا می‌باشد.

تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده در این پژوهش می‌توانند در روز اول پیشگویی کننده مقدار فعال شدن پلاکت‌ها باشند(۲۰).

در سال ۱۹۹۵، دایورز و همکاران میزان تغییرات pH در پلاکت‌های متراکم نگهداری شده را طی سه روز مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار میزان pH در روز سوم نسبت به روز اول بود(۲۱). این نتایج با نتایج حاصل از پژوهش ما مشابه بوده است.

در پژوهشی که در سال ۱۹۹۵ توسط زیگنیو و همکاران انجام گرفت، دو روش تهیه پلاکت یعنی روش بافی‌کوت و PRP مورد بررسی قرار گرفت به طوری که طی ۵ روز نگهداری میزان pH ، بیان P-Selectin و تجمع پلاکتی با آگونیست ADP بررسی شد. در بررسی فوق میزان pH در پلاکت‌های تهیه شده به روش PRP از روز اول تا روز پنجم تفاوت معنی‌داری نیافته بود. این نتیجه، نتایج به دست آمده از پژوهش ما را تایید نمی‌کند. در این پژوهش، آزمایش تجمع پلاکتی با آگونیست ADP بررسی شد که از روز اول تا پنجم کاهش معنی‌داری یافته بود. مقادیر بیان P-Selectin طی مدت نگهداری افزایش یافته بود که این یافته مشابه با نتایج مطالعه ما می‌باشد(۲).

در پژوهشی که در سال ۱۹۹۷ توسط هولمه و همکاران انجام شد، میزان بیان P-Selectin پلاکت‌های متراکم طی نگهداری مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد که میزان بیان P-Selectin در روز اول ۱۳ ± ۳۰ درصد و در روز پنجم ۱۷ ± ۵۱ درصد بوده است(۲۳). این افزایش میزان بیان P-Selectin با گذشت زمان مشابه مطالعه‌ای بوده است که در سال ۱۹۹۸ توسط واشیتانی و همکاران انجام گرفت، در مطالعه فوق میزان تجمع پلاکتی با آگونیست‌های ADP و کلاژن بررسی شده و مشخص گردیده که طی مدت نگهداری تجمع

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

پلاکتی با آگونیست ADP به میزان ۳۳ درصد و با آگونیست کلاژن به میزان ۵۵ درصد کاهش می‌یابد(۲۴).

در پژوهش‌های مشابه دیگری که در سال ۲۰۰۳ توسط کاردیگان و همکاران و پروتا و همکاران انجام شد، میزان بیان P-Selectin بررسی گردید و گزارش شد که میزان بیان این مارکر در طی نگهداری افزایش می‌یابد(۲۶، ۲۵). یعنی مشابه با مطالعه ما در طی گذشت زمان، پلاکت‌ها فعال می‌شوند.

در همین سال کوکازیبک و همکاران در مطالعه‌ای اثر آگونیست‌های ADP ، کلاژن، اپی‌نفرین و ریستوستین روی پلاکت‌های متراکم را در طی روزهای مختلف نگهداری مورد بررسی قرار دادند. آزمایش تجمع پلاکتی با استفاده از این آگونیست‌ها کاهش معنی‌داری را در روز پنجم نسبت به روز اول نشان داد(۲۷).

در سال ۲۰۰۳ در پژوهش دیگری که توسط نیوا و همکاران انجام شد، تغییرات pH و تجمع پلاکت‌ها با آگونیست‌های ترومبین و کلاژن در پلاکت‌های متراکم مورد بررسی قرار گرفت. میزان pH در روز اول ۰/۴ ± ۷/۰۷ و در روز سوم ۰/۰۷ ± ۷/۳۶ بود و آزمایش تجمع پلاکتی با آگونیست ترومبین در روز اول ۷/۷ ± ۶۱/۸ و در روز سوم ۹/۸ ± ۲۴/۸ درصد و با آگونیست کلاژن به ترتیب در روزهای اول و سوم ۵ ± ۶۲/۷ و ۶/۲ ± ۳۳/۴ درصد بوده است که این نتایج مانند نتایج مطالعه ما نشان‌دهنده کاهش میزان تجمع پلاکتی می‌باشد.

طبق نظر این محققین افزایش pH می‌تواند به دلیل قابلیت نفوذپذیری بیشتر کیسه‌های مورد استفاده به گازها باشد که باعث عدم تعادل در H_2CO_3/HCO_3 محیط نگهدارنده می‌شود. این امر، عدم کارآیی سیستم بافری را به دنبال داشته و باعث تغییرات pH می‌شود. در تحقیق ما ارتباط خوبی بین تجمع پلاکتی، میزان P-Selectin و pH مشاهده شد که بنا به نظر نیوا و همکاران این امر می‌تواند به دلیل تغییر در وضعیت غشای پلاکت به همراه فاکتورهای دیگر مانند متابولیسم بی‌هوازی و یا میزان L-Lactat باشد که نهایتاً باعث افزایش pH هم می‌شود(۲۸).

با توجه به موارد ذکر شده در بالا و یافته‌های به دست آمده در این مطالعه و مطالعات پیشین، مشخص شد که پلاکت‌ها در طی نگهداری فعال می‌شوند. با توجه به این که استاندارد طلایی بررسی عملکرد پلاکتی، بررسی بقای پلاکت‌های نشاندار شده پس از تزریق می‌باشد، به دلیل این که آزمایش‌های *In vivo* دارای مقادیری از خطر هستند و در بسیاری از مطالعات از فاکتورهای مورد استفاده در این پژوهش به عنوان عامل پیشگویی‌کننده فعالیت پلاکت‌ها پس از تزریق یاد کرده‌اند، باید آزمایش‌های *in vitro* جهت بررسی و کنترل عملکرد محصولات پلاکتی تولید شده موجود باشد. با توجه به این که روش فلوسیتومتری روش حساس‌تر و اختصاصی‌تری نسبت به آزمایش تجمع پلاکتی می‌باشد و این که گرانول‌های آلفا که حاوی P-Selectin هستند، پس از فعال شدن تقریباً تمامی محتویات خود را به طور کامل آزاد می‌کنند، ارزیابی P-Selectin می‌تواند روش بسیار مفیدی برای بررسی عملکرد پلاکت‌های تزریق شده باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که زمان نگهداری و روش تولید از عوامل مؤثر در فعال شدن پلاکتی می‌باشند به طوری که میزان بیان P-Selectin با گذشت زمان افزایش معنی‌داری یافته و درصد تجمع پلاکتی با گذشت زمان کاهش معنی‌داری یافته است. از آن جایی که از این فرآورده در مواقع اضطراری برای جلوگیری از خونریزی در بیماران استفاده می‌شود و متاسفانه در ایران هنوز روش فراگیری برای کنترل کیفی فعالیت عملکردی پلاکت‌ها بنا نشده است، لازم است که آزمون‌های عملکردی با استفاده از روش‌های حساس در برنامه کنترل کیفی این فرآورده گنجانده شود. با توجه به ارتباط بین افزایش P-Selectin و کاهش تجمع پلاکتی با گذشت زمان و هم چنین این که اندازه‌گیری P-Selectin در مقایسه با آزمایش تجمع پلاکتی ساده‌تر است و نیاز به زمان کمتری در بررسی عملکرد پلاکت‌ها دارد، می‌توان همان طوری که در اکثر کشورهای جهان از این روش برای کنترل کیفی پلاکت‌های تهیه شده استفاده می‌شود، اندازه‌گیری این پارامتر را در برنامه کنترل کیفی‌فرآورده‌های پلاکتی کشور

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

گنجاند. علاوه بر این در بسیاری از پژوهش‌ها نتیجه‌گیری شده که استفاده از مواد افزودنی جهت تعلیق و نگهداری پلاکت‌ها می‌تواند از فعال شدن پلاکت‌ها بکاهد و بر کیفیت محصول تولید شده بیفزاید(۱۲). لذا پیشنهاد می‌شود که این امر پایه‌ای برای پژوهش‌های بعدی در جهت بالابردن کیفیت این محصول قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از خانم فاطمه بابا حسینی به دلیل همکاری در طرح تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References :

1- Henry JB. Hematology, Coagulation and Trasfusion Medicine, hematology Clinical diagnosis & management by laboratory methods. 20th edition. 2001 Philadelohia;Saunders:623-641.
2- Cardigan R, Turner C , Harrison P. Current methods of assessing platelet function; relevance to transfusion medicine. Vox Sanguinis 2005;88(3):153-163.
3- Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. Circulation 2000;102 :1931-6.
4- Chong H, Murry B ,Berndt MC, *et al*. Plasma P-Selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders .Blood 1994;83:1533-40.
5- Gutensohn K, Geidel K, Brockmann M, *et al*. Binding of activated platelets to WBCs in vivo after transfusion. Transfusion 2002;42(10):1373-80.
6- Greer J P, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader BE. Platelet function in hemostasis and thrombosis, Wintrobe's clinical hematology. 11th edition. 2004. Philadelohia; Lippincott Williams & Wilkins:605-650.
7- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Betlage S, TschÖpe D, Clemetson KJ, *et al.* European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flowcytometric characterization of platelet function. Thromb Hemost 1998;79:885-896.
8- Scheinichen D, Heuft HG, Renken C, Juttner B *et al*. Impact of tobacco smoking on platelet function in aphaeresis product *in vitro*. Vox Sanguinis 2004; 86(4):252-256.
9- Rinder HM, Smith BR. *in vitro* evaluation of stored platelets: is there hope for predicting post transfusion platelet survival and function? Transfusion 2003;43;2-6.
10- Alan D, Michelson AD, Mare R *et al*. Evaluation of platelet function by flowcytometry. Methods 2000;21:259-270.
11- Dijkstra –Tiekstra, Pietersz RNI, Huijgens PC. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and *in vitro* and in vivo parameters .Vox Sanguinis 2004; 87(4):258-263.
12- Karnicki K, Johnson C, St Cyr J, Ericson D, Rao G. Platlet storage improves the *in vitro* function of preserved platelet concentrate. Vox Sanguinis 2003;85:262-266.
13- De wildt-Eggen J, Schrijver JG, Smid WM *et al*. Platelet stored in a new-generation container: differences between plasma and platelet additive solution II. Vox Sanguinis 1998;75:218-23.
14- Wang C, Mody M, Herst R, Sher G, Freedman J. Flowcytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. Transfuse sci 1999;20(2):129-139.
15- Synder EL, Hezzy A, Bioner Y *et al*. Occurrence of the release reaction during preparation and storage of platelet concentrated. Vox Sanguinis 1981;41(3):172-7.
16- Fijnher R, Pieterze R, Dekorte D *et al*. Platelet activation during preparation of platelet concentrates. Transfusion 1990;30:219-30.
17- Kevy S, Jacobson M. *in vitro* evalution of pltelets collected with the harvest smartprep/symphony platelet concentrate system. 2001. www.Hrvesttech.com/in-vitro.testing.Adf
18- Fijnher R, Modderman H, Veldman H *et al*. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flowcytometry. Changes during platelet storage. Transfusion 1990;30(1):20-25.
19- Rinder HM, Snyder EL. Activation of platelet concentrates during preparation and storage. Blood Cell 1992;18(3):445-460.
20- Rinder HM, Snyder EL, Bonan JL et al. Activation in stored platelet concentrates correlation between membrane expression of p-Selectin, glycoprotein IIb/IIIa and Beta-thromboglobulin release. Transfusion 1993;35(1)25-29.
21- Divers SG, Kannan K, Stewart RM *et al*. Quantitation of CD62, soluble CD62 and lysosome–associated membrane protein 1 and 2 for evaluation of the quality of stored platelet concentrates. Transfusion 1995;35(4):292-297.
22- Zbigniew R, Oleksoxicz L, Ditcher J *et al*. A novel technique for preparing improved buffy coat platelet concentrates.blood cell. Molecules and Disease 1995;21(3) 15:25-33.
23- Holmes S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD. The expression of p-Selectin during collection, processing and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. Transfution 1997;37:12-17.
24- Washitani Y, Irita Y, Yamamato K, Shiraki H *et al*. Prevention of acquired defects in platelet function during blood processing. Transfusion 1988;28:571-5.
25- Cardigan R, Williamson LM. The quality of platelets after storage for 7 dayes. Trans Med 2003;13:173-187.
26- Perrotta PL , Perrotta CL , Snyder EL . Apoptotic

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

activity in stored human platelet. Transfusion 2003; 43(4):526-535.
27- Kocazeybec B, Arabaci V, Akdur H, Sezgic M *et al*. Prospective evaluation of platelet prepared by singleand random method during 5 days of storage; aspects related to quality and quantity, Transfusion and Apheresis Sci 2002;26(1):29-34.
28- Neiva T, Machado M, Hohn M, Hermes E, vituri C *et al*. Evaluation of platelets aggregation in platelet concentrates: storage implications. Hemoter 2003;25(4):207-12.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]

In vitro evaluation of P-Selectin expression of platelet and platelet aggregation in stored platelet concentrates

Sadri A.[1](DMT), Gharehbaghian A[1].(PhD), Vaeli Sh.[1](DMT), Asgari Pour F.[1](DMT), Karbasizadeh M.[1](DMT),Ghaledi J.[1](DMT), Aghayeepour M.[1](MD), Shashaani T.[1](BS), Tabatabaeeian A.S.[1](BS), Kami F.[1](BS), Ahmadinejad M.[1](MD),

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization – Research Center*

Abstract

Background and Objectives

Platelets have a major role in haemostasis. Platelet concentrates are used in thrombocytopeny and platelet dysfunction disorders. Due to recent studies reporting loss of in vivo function of platelets in platelet concentrate units, we determined the level of surface expression of P-Selectin, conducted platelet aggregation tests and pH measurment to evaluate platelet activation during storage.

Materials and Methods

In a cross-sectional study, 100 platelet concentrate units prepared by PRP method were evaluated. 34, 33 and 33 units were taken from the first, second, and third day of storage respectively. For each platelet concentrate unit, pH, CD62P-Selectin and platelet aggregation tests with Arashidonic acid and Ristocetin agonists were conducted.

Results

Expression of P-Selectin in third day was significantly higher than first day ($p<0.05$). Platelet aggregation tests showed significant decrease in third day compared to first day ($p<0.05$). pH in third day was significantly higher than first day ($p<0.05$).

Conclusions

The present study shows that activated platelets during 3 days of storage have increased P-Selectin on their surface. Therefore, the P-Selectin expression can be used as an in vivo marker for platelet activation function.

Key words: Platelet , P-Selectin, Flowcytometery, Platelet aggregation
SJIBTO 2007; 4(3): 205-213

Received: 17 Jan 2007
Accepted:15 Oct 2007

Correspondence: Gharehbaghian A., PhD of Clinical Immuno Hematology. IBTO–Research Center. P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax:(+9821)88601599
E-mail: *gharehbaghian@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-03]