

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۱۱ شماره ۱ بهار ۹۳ (۳۱-۲۲)

مقاله پژوهشی

## اختلالات عملکرد پلاکتی در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع انعقاد سازمان انتقال خون ایران

علی رجبی<sup>۱</sup>، مینو احمدی نژاد<sup>۲</sup>، مریم مشکولی<sup>۳</sup>، سید محمد رضا طباطبایی<sup>۴</sup>، سیده لادن سید مرتابخ<sup>۵</sup>، سمیه رن بلوج<sup>۶</sup>،  
سیده سمیه معززی نکوبی اصل<sup>۷</sup>، زهره مختاری<sup>۸</sup>، مهسا مجتبی نائینی<sup>۹</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

اختلالات ارثی عملکرد پلاکتی در دنیا معمول می‌باشد اما در ایران به دلیل محدودیت امکانات تشخیصی، به جز موارد شدید بیماری، این اختلالات به طور دقیق بررسی نشده‌اند. در این تحقیق، طی دو سال اخیر در آزمایشگاه مرجع انعقاد سازمان انتقال خون ایران، به کمک دستگاه لومی اگریگومتر، اقدام به بررسی آزمون‌های عملکرد پلاکتی در بیماران مشکوک به اختلالات مذکور شده است.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی گذشته‌نگر، پرونده ۱۹۵ مراجعه کننده به آزمایشگاه یاد شده، طی مدت هفت ماه در فاصله آبان ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ۱۳۹۱، توسط آزمون تجمع پلاکتی بررسی شدند و در بیماران مشکوک به اختلال ترشح پلاکتی، بررسی آزادسازی ATP نیز انجام گرفت. از آگونیست‌های ADP، کلائز، اسید آراشیدونیک و ریستوستین و ماده لومی‌نسانس برای بررسی تجمع و ترشح پلاکتی استفاده گردید. یافته‌های حاصل با استفاده از ۱۶ SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

از میان ۱۹۵ مراجعه کننده، ۹۰ مورد (۴۶/۱٪) دارای اختلال پلاکتی بودند. این افراد شامل بیماران مبتلا به ترومبوستیوپنی با عملکرد طبیعی (۸/۸٪)، اختلال ترشح (۷/۶٪)، ترموباستنی گلانزمن (۶/۴٪)، سندروم برنارد سولیر (۲/۲٪)، اختلال اکتسابی پلاکتی (۱/۵٪)، آفیرینوژنی (۰/۰۵٪) و اختلال عملکردی دسته‌بندی نشده (۶/۲٪) بودند. ۱۰۵ مورد باقی مانده (۵۳/۸٪)، هیچ نقص کمی و کیفی پلاکتی نداشتند.

#### نتیجه گیری

تحقیق حاضر حاصل نخستین مطالعه بررسی هم‌زمان اختلالات عملکرد و ترشح پلاکتی در ایران است. برای پی بردن به شیوع دقیق این بیماری‌ها، بررسی‌های بیشتر و دارای حجم بالاتر بیماران، استفاده از پانل آگونیستی متنوع تر و نیز بررسی ترشح پلاکتی در تمامی بیماران دارای اختلالات تجمع پلاکتی در مطالعه‌های آنی توصیه می‌شود.

**کلمات کلیدی:** اختلالات پلاکتی، آزمون‌های عملکرد پلاکتی، تجمع پلاکتی، سندروم برنارد سولیر، ترموباستنی

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲۰

- ۱- دانشجوی PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسؤول: متخصص آسیب‌شناسی بالینی و تشریحی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
- ۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۵- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۶- کارشناس علوم سلولی و مولکولی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۷- کارشناس ارشد انگل شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۸- کارشناس شیمی کاربردی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

عملکرد پلاکت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ترشح محتویات گرانولهای متراکم پلاکت‌ها به وسیله رهاسازی سروتونین- کربن ۱۴ متعاقب تحريك توسط آگونیست‌های پلاکتی و یا به روش ساده‌تر توسط رهاسازی ATP از گرانول‌ها به وسیله یک روش کمی‌لومینسانس قابل ارزیابی است. ناهنجاری‌های ترشحی پلاکت‌ها، به دلیل عدم رهاسازی گرانول‌های پلاکتی، اغلب به وسیله هر دو آزمون تجمع و ترشح پلاکتی قابل شناسایی هستند. به طوری که در آزمون تجمع پلاکتی، موج دوم تجمع به ویژه با آگونیست‌های ADP و اپی‌نفرین که به طور اساسی وابسته به ترشح گرانول‌های متراکم است، دیده نمی‌شود. بررسی اختلالات ترشحی برخلاف آزمون تجمع پلاکتی، به دلیل هزینه بالا و وقت‌گیر بودن آن تنها در آزمایشگاه‌های مرجع انعقادی قابل انجام است (۲-۶).

به خاطر این که آزمون‌های تشخیصی اختلالات عملکرد پلاکتی گران و وقت‌گیر هستند و به طور گستردۀ در دسترس نیستند، تاکنون مطالعه‌ای مبتنی بر جمعیت برای تعیین شیوه اختلالات یادشده انجام نشده است. با این حال، اطلاعاتی در مورد شیوه نسبی اختلالات پلاکتی در مقایسه با دیگر مشکلات خونریزی‌دهنده (مثل بیماری فون‌ویلبراند) وجود دارد که بیانگر این هستند که اختلالات پلاکتی در جمعیت بسیار معمول می‌باشد و امکان دارد که شیوعی معادل و یا حتی بیشتر از بیماری فون‌ویلبراند داشته باشند (۷، ۳).

در ایران نیز هر چند بررسی‌هایی روی انواع شدید بیماری‌های پلاکتی یعنی ترومباستنی گلانزمن و سندروم برنارد سولیر صورت گرفته است، اما به دلیل محدودیت روش‌های تشخیصی بیماری‌های پلاکتی در ایران، شیوع این گروه از اختلالات خونریزی‌دهنده به خوبی شناخته شده نیست (۸-۱۱). هم چنین تاکنون هیچ گزارشی از بررسی اختلالات ترشح پلاکتی در کشور در دست نمی‌باشد. در آزمایشگاه مرجع انعقاد ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ایران، از دو سال پیش تاکنون، در بیماران دارای مشکلات خونریزی‌دهنده که برای بررسی عملکرد پلاکتی مراجعه کرده بودند، علاوه بر بررسی تجمع پلاکتی، اقدام به بررسی میزان ترشح ATP در موارد مشکوک به

**مقدمه**  
اختلالات پلاکتی، از شایع‌ترین اختلالات خونریزی‌دهنده هستند. پلاکت‌ها تعدادی از گیرنده‌های غشایی گلیکوپرteinی را بیان می‌کنند که چسبندگی (adhesion) و تجمع (aggregation) پلاکتی را میانجی‌گری می‌نمایند. بیشترین میزان گیرنده غشایی پلاکت‌ها، مربوط به ایتگرین  $\alpha IIb\beta 3$  است که بیشتر به نام گلیکوپروtein  $\alpha IIb\beta 3$  شناخته می‌شود. این گیرنده در مرحله تجمع پلاکتی نقش اصلی را به عهده دارد. کمبود یا عملکرد ناقص  $\alpha IIb\beta 3$  منجر به اختلال شدید خونریزی‌دهنده به نام ترومباستنی گلانزمن (Glanzmann thrombasthenia، GT) می‌شود. گیرنده‌های دیگری هم بر روی پلاکت‌ها وجود دارند که برای عملکرد پلاکتی اهمیت دارند. در این میان، گیرنده حاوی تکرارهای غنی از لوسین به نام گلیکوپروtein Ib/V فون‌ویلبراند نقش حیاتی دارد. کمبود یا اختلال عملکرد گیرنده Ib/V نیز با یک اختلال پلاکتی شدید به نام سندروم برنارد سولیر (Bernard Soulier Syndrome, BSS) همراه است (۱).

آزمون‌های عملکرد پلاکتی شامل تجمع و ترشح پلاکتی اغلب در ارزیابی بالینی بیماران دارای مشکلات خونریزی‌دهنده درخواست می‌شود (۲).

در آزمایشگاه‌های بالینی، به طور معمول از آگونیست‌های تجاری ADP، اپی‌نفرین، کلارژن و اسید آراشیدونیک و به علاوه آگونیست صناعی ریستوتین استفاده می‌گردد. ADP و اپی‌نفرین جزو آگونیست‌های ضعیف پلاکتی محسوب می‌شوند. آگونیست‌های متنوع دیگری هم وجود دارند که هر آزمایشگاه بسته به برنامه و بودجه و تجربه کاری خود از آن‌ها استفاده می‌کند، اما هیچ الگوی استانداردی برای انجام آزمایش، مقادیر مرجع و تفسیر آزمون‌های کیفی پلاکتی وجود ندارد. البته در این بین، دو بیماری ترومباستنی گلانزمن و سندروم برنارد سولیر الگوی تجمع پلاکتی مشخصی دارند. بنابراین هر آزمایشگاه باید با توجه به امکانات و بیماران خود، الگوی مطلوب آزمایش‌های خود را به دست بیاورد (۲، ۳).

بررسی ترشح گرانول‌های پلاکتی، در ارزیابی اختلالات

ADP با غلظت‌های بالا ( $10\text{ }\mu\text{M}$  و  $20\text{ }\mu\text{M}$ ) و کلاژن با غلظت بالا ( $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) نیز بررسی شد تا پاسخ‌های ضعیف شناسایی شوند. برای بیمارانی که پاسخ برگشت‌پذیر به آگونیست‌ها می‌دادند، بررسی ترشح ATP پلاکتی با استفاده از ماده لومینسانس محتوی لوسيفرین-لوسيفراز انجام می‌شد. همه معرف‌های مورد استفاده از شرکت Helena فرانسه خریداری شدند. آزمون سنجش ترشح پلاکتی نیز با معرف Chemi-Lume از شرکت کرونولوگ انجام پذیرفت و با استفاده از یک ATP standard مربوط به همان شرکت، میزان رهاسازی نور حاصل از عملکرد آنزیم-سوپسترا استانداردسازی شد. برای بیمارانی که نیاز به بررسی ترشح پلاکتی داشتند، پس از افزودن ماده لومینسانس (محتوی لوسيفرین و لوسيفراز) به PRP و افزودن آگونیست مورد نظر، به طور هم زمان تجمع و ترشح پلاکتی بررسی شد. نتیجه این واکنش بر روی سیستم مانیتورینگ به صورت دو نمودار با رنگ‌های مجزا برای هر آگونیست ظاهر می‌شد.

**تعیین مقادیر طبیعی پاسخ‌دهی به آگونیست‌ها:**  
فاصله اطمینان مقادیر طبیعی برای آزمون‌های تجمع پلاکتی با آزمایش ۲۲ فرد سالم که با گرفتن شرح حال، قادر مشکلات خونریزی دهنده و یا بیماری‌های مزمن بودند و طی ۱۰ روز قبل از نمونه‌گیری هیچ گونه دارو و یا عوامل شناخته شده تاثیرگذار بر روی عملکرد پلاکت مصرف نکرده بودند، به دست آمد.

پس از انجام آزمایش تجمع با آگونیست‌های ADP ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ،  $20\text{ }\mu\text{M}$  و  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ، اسید آراشیدونیک)، کلاژن ( $1/5\text{ mg/mL}$ ، میانگین  $\pm$  SD تعیین شد. در زمان انجام این مطالعه به دلیل هزینه بالای ماده لومینسانس، بررسی تعیین محدوده طبیعی پاسخ ترشح پلاکتی انجام نشد و لذا جهت تفسیر نتایج، فاصله اطمینان طبیعی ترشح پلاکتی گزارش شده بر اساس بروشور شرکت سازنده دستگاه کرونولوگ تعریف و تنها با انجام یک نمونه کترول تایید شد. بر اساس فاصله اطمینان مقادیر طبیعی پاسخ‌دهی به آگونیست‌ها و لوسيفرین-لوسيفراز، نتایج پاسخ‌دهی بیمارانی که خارج از محدوده

اختلالات ترشح پلاکتی شد. در این مطالعه از آگونیست‌های ADP، کلاژن، اسید آراشیدونیک و ریستوستین برای ارزیابی تجمع پلاکتی و از ماده لومینسانس محتوی لوسيفرین-لوسيفراز برای بررسی وضعیت ترشح پلاکتی استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

بر اساس یک مطالعه توصیفی و گذشته‌نگر (descriptive retrospective)، طی هفت ماه (از اول آبان ۱۳۹۰ تا آخر اردیبهشت ۱۳۹۱)، تعداد ۱۹۵ فرد (۶۶ مرد و ۱۲۹ زن،  $F/M = 2/1$ ) مشکوک به اختلالات خونریزی دهنده که با درخواست آزمایش بررسی عملکرد پلاکتی به آزمایشگاه انعقاد ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ایران مراجعه کرده بودند، با مراجعه به پرونده‌های بالینی و آزمون‌های آزمایشگاهی بیماران، مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌گیری و انجام آزمون تجمع و ترشح پلاکتی، بر اساس دستورالعمل‌های موجود در بخش انعقاد، برای همه بیماران انجام شد. بر اساس، نمونه‌گیری توسط لوله‌های خلاء (Vacutainer) مربوط به شرکت BD انگلستان حاوی ضد انعقاد سیترات سدیم  $105\text{ }\mu\text{l}$  مولار انجام شد.

پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) با استفاده از نمونه خون سیتراته و سانتریفیوژ با دور پایین (RCF بین  $30\text{--}150\text{ g}$ ) اساس شمارش پلاکت اولیه فرد و پلاسمای قادر پلاکت (PPP) با استفاده از سانتریفیوژ با دور بالا (RCF بین  $2500\text{--}3000\text{ g}$ ) به دست آمد. جمع آوری، انتقال و سانتریفیوژ نمونه‌ها در دمای اتاق صورت گرفت.

بر اساس درخواست پزشک معالج، برای همه بیماران آزمایش تجمع پلاکتی در دستگاه اگریگومتر ساخت شرکت کرونولوگ آمریکا (Chronolog model 700 x, Havertown, Pennsylvania (PA)) و با پانل اولیه آگونیست‌های زیر انجام شد: ADP (غلظت  $5\text{ }\mu\text{M}$ ، کلاژن ( $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ ، آراشیدونیک اسید ( $1/5\text{ mg/mL}$  و ریستوستین ( $1/5\text{ mg/mL}$ ). در صورتی که پاسخ پلاکت‌های بیمار با غلظت‌های معمول ADP و یا کلاژن در پانل اولیه، در مقایسه با مقادیر مرجع، ضعیف و یا برگشت‌پذیر بود،

EDTA، بین  $10^9/L$  و  $12-482 \times 10^9/L$  فاصله اطمینان  $100 \pm 204$  (Mean  $\pm$  SD) بود. البته یک بیمار دارای ترموبوستیوز شدید با شمارش پلاکتی  $L \times 10^9$  از  $1900 \times 10^9$  محسابه فوق حذف گردید. از میان ۱۹۵ مراجعه‌کننده، ۶۷ بیمار (۴٪/۳۴) دارای ترموبوستیوز پلاکت اولیه کمتر از  $L \times 10^9$  (۱۵۰) بودند.

پس از تهیه PRP (بر روی خون سیتراته)، شمارش پلاکتی بین  $10^9/L \times 9-671$  و  $10^9/L \times 139$  فاصله اطمینان  $\pm 295$  در تغییر بود.

به طور کلی از میان ۱۹۵ مراجعه‌کننده، ۱۰۵ مورد (۵٪/۸) از نظر شمارش و عملکرد پلاکتی کاملاً طبیعی و ۹۰ مورد (۱٪/۴۶) دارای اختلال کمی و/یا کیفی پلاکتی بودند. بیماران دارای اختلال کمی و کیفی پلاکتی شامل موارد زیر بودند: ۴۴ بیمار (۲٪/۲۲) اختلالات عملکردی پلاکتی دسته‌بندی نشده، ۱۶ بیمار (٪/۸) ترموبوستیوز پلاکتی دارای طبیعی پلاکتی، ۱۳ بیمار (٪/۶۷) اختلال ترشح ATP (رهاسازی گرانولی)، ۹ بیمار (٪/۴۶) ترمومباستنی گلانزمن، ۴ بیمار (٪/۲) برnard-Sollier، ۳ بیمار (٪/۱۵) اختلالات پلاکتی به دلیل مصرف دارو (اختلال پلاکتی اکتسابی) و یک بیمار (٪/۰۵) اختلال پلاکتی به دلیل آفیرینوژنی (نمودار ۱). ۶ مورد از ۹ بیمار دارای الگوی ترمومباستنی گلانزمن، و ۳ مورد از ۴ بیمار دارای الگوی برnard-Sollier در آزمون تجمع پلاکتی، توسط بررسی فلوسیتومری تایید شدند.

بیماران دارای پاسخ برگشت‌پذیر به آگونیست‌ها به ویژه نسبت به ADP، مورد ارزیابی آزادسازی ATP قرار گرفتند. همه این بیماران (۱۳ مورد)، در پاسخ به ترشح القا شده توسط ADP مختل بودند. در این میان، ۵ بیمار به هر سه آگونیست ADP، اسید آراشیدونیک و کلائز، ۴ بیمار به ADP و کلائز، یک بیمار به ADP و اسید آراشیدونیک و ۳ بیمار تنها به ADP پاسخ ترشحی منفی دادند.

والدین بیماران گلانزمن از نظر خویشاوندی، سه مورد فامیل نزدیک و شش مورد غریب بودند، اما در مورد بیماران برnard-Sollier، دو مورد از بیماران دارای والدین با نسبت فامیلی نزدیک، یک مورد فامیل دور و یک مورد هم غریب بودند.

طبیعی هر آگونیست قرار می‌گرفت، به عنوان "غیرطبیعی" در نظر گرفته می‌شد. نتایج مطالعه با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مربوط به شرکت Polar Engineering تجزیه و تحلیل شد.

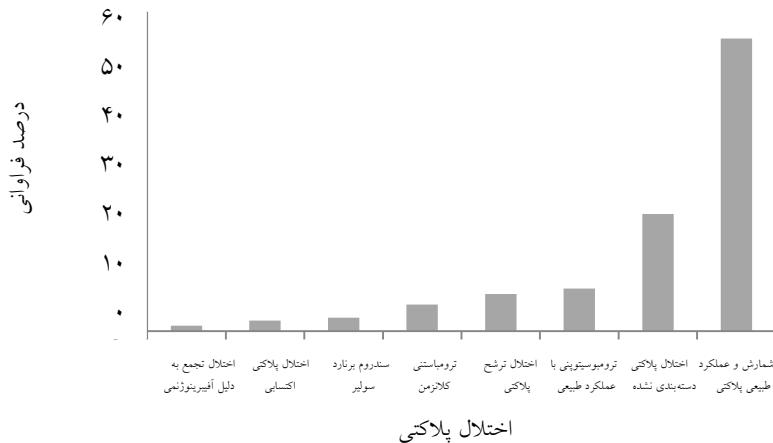
#### یافته‌ها

این پژوهش بر پایه یک مطالعه گذشته‌نگر بر روی ۱۹۵ فرد دارای مشکلات خونریزی دهنده طراحی شده که به منظور بررسی عملکرد پلاکتی به آزمایشگاه مرجع انعقاد ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ایران مراجعه کرده بودند. سن بیماران مراجعه‌کننده از یک ماه تا ۸۱ سال و با میانگین ۲۸ سال بود. ۶۱٪/۵ بیماران، بالغین بین سنین ۱۸ تا ۵۰ سال بودند.

علت مراجعه ۴۶٪/ بیماران مراجعه کننده (۸۹ نفر)، مشکلات خونریزی جلدی - مخاطی مانند خونریزی بینی و لثه، اکیموز و خونریزی‌های قاعدگی (منوراژی) بود. دیگر بیماران با علی‌مانند بررسی علت ترموبوستیوز پلاکتی (٪/۳۹) مورد، ترموبوستیوز شدید (یک مورد)، خونریزی دستگاه گوارش (یک مورد) و دیگر علل متفرقه (۶۵ مورد) مانند بررسی چک‌آپ روتین، چک‌آپ قبل یا بعد از جراحی و سابقه خانوادگی مشکلات خونریزی دهنده یا کمبود فاکتورهای انعقادی به این مرکز ارجاع داده شده بودند. ۱۲۹ نفر (٪/۶۶) از مراجعین را زنان و ۶۶ نفر (٪/۳۳) را مردان تشکیل می‌دادند.

بر اساس شرح حال بیماران، درجه خونریزی (bleeding score) بر اساس معیار توزتو و همکاران، در ٪/۶۲ بیماران کمتر از ۲، ٪/۲۸ دو مورد بیشتر یا مساوی ۳-۵ و در ٪/۹۶ موارد بیشتر یا ۶ بود (٪/۱۲). از میان ۱۹۵ مراجعه‌کننده، ۴ بیمار داروهای ضد پلاکت مانند آسپیرین و پلاویکس و ۹ بیمار داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی مصرف می‌کردند. در این میان، ۲ بیمار مصرف کننده آسپیرین و یک بیمار مصرف کننده ایبوپروفن دارای آزمون تجمع پلاکتی مختل شده بودند. دیگر بیماران این گروه، آزمون تجمع طبیعی داشتند.

**نتایج آزمایشگاهی:**  
شمارش پلاکت اولیه بیماران بر روی خون دارای



نمودار ۱: توزیع فراوانی اختلالات پلاکتی در بیماران دارای مشکلات خونریزی دهنده

عنوان "غیر طبیعی" در نظر گرفته شدند(جدول ۱). فاصله اطمینان طبیعی آزمون ترشح پلاکتی (ATP release) بر اساس کتابچه دستگاه اگریگومتر تعیین شد(جدول ۲).

**بحث**  
شیوع دقیق اختلالات عملکرد پلاکتی در دنیا مشخص نشده است اما در کل، ترومباستنی گلانزمن و سندروم برنارد سولیر جزو اختلالات نادر محسوب می‌شوند. به نظر می‌رسد که شیوع گلانزمن حدود یک مورد در هر یک میلیون نفر جمعیت است(۱۳). با این حال، شیوع آن می‌تواند به اندازه هموفیلی و بیماری فون ویلبراند در جمعیت‌هایی که ازدواج‌های فامیلی معمول است نیز بررسد (۱۴-۱۵)، مثلاً در یهودیان عراقی و یا اعراب فلسطین و اردن که می‌تواند تا ۶ مورد در هر ۷۰۰ نفر جمعیت هم رخدده دهد (۱۶، ۱۷).

شیوع سندروم برنارد سولیر در جوامع عمومی کمتر از یک در یک میلیون است(۱۸). در گروه‌های نژادی خاصی مانند بیماران عراقی و در نواحی که ازدواج‌های فامیلی معمول است مثل جنوب هند و شمال ایران، شیوع برنارد سولیر بیشتر است(۱۳، ۱۰).

اگرچه بر اساس مطالعه‌های قبلی انجام شده در ایران، این فرضیه مطرح شده بود که شیوع بیماران گلانزمن و برنارد سولیر در جمعیت ایرانی بالاتر از میانگین دنیا است،

جدول ۱: فاصله اطمینان پاسخ‌دهی نمونه‌های کنترل افراد سالم به آگونیست‌های مورد استفاده در آزمون تجمع پلاکتی

آگونیست(غلظت)	Mean ± SD
(۵ μM) ADP	۷۵-۹۱
(۱۰ μM) ADP	۷۳-۹۵
(۲۰ μM) ADP	۸۰-۹۷
اسید آراشیدونیک(۰/۵ mM)	۸۲-۹۸
کلانزن(۲ μg/mL)	۸۱-۹۵
کلانزن(۵ μg/mL)	۷۹-۹۵
ریستوستین(۱/۵ μg/mL)	۷۸-۹۶

جدول ۲: فاصله اطمینان پاسخ طبیعی ترشح پلاکتی بر اساس بروشور دستگاه کرونولوگ

آگونیست القا کننده ترشح ATP	فاصله اطمینان پاسخ طبیعی ترشح (nMole)
۱۰ μM ADP	۰/۰۵-۱/۰۶
کلانزن L ۵ μg/mL	۰/۷۴-۱/۹۲
اسید آراشیدونیک ۰/۵ mM	۰/۰۶-۱/۴

نتایج نمونه‌های کنترل طبیعی بر اساس آزمایش تجمع پلاکتی بر روی افراد سالم با مشخصات ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها به دست آمد و فاصله اطمینان مقادیر طبیعی به صورت  $Mean \pm SD$  محاسبه گردید. افرادی که میزان پاسخ‌دهی خارج از این فاصله داشتند به

مورد کلژن، از دوز  $\mu\text{g/mL}$  ۲ برای تمامی بیماران استفاده شد و بیمارانی که با این دوز پاسخ ضعیف یا عدم پاسخ را نشان می‌دادند، با دوز  $\mu\text{g/mL}$  ۵ نیز بررسی شدند. با این حال معیار تشخیص موارد طبیعی یا غیر طبیعی، میزان پاسخ‌دهی به دوز  $\mu\text{g/mL}$  ۲ کلژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل بود. آگونیست‌های اسید آراشیدونیک( $\text{mM}$ ) ۰/۵ و ریستوستین( $\text{mg/mL}$ ) ۱/۵ نیز هر کدام در یک دوز واحد در این پژوهش استفاده شدند و معیار پاسخ طبیعی یا غیر طبیعی به این آگونیست‌ها، میزان پاسخ به آگونیست در مقایسه با نمونه‌های کنترل بود.

تاکنون مطالعه‌های تجمع پلاکتی در ایران به صورت محدود انجام شده است. به علاوه، هیچ مطالعه‌ای در مورد ترشح پلاکتی و نیز ترکیب تجمع و ترشح پلاکتی صورت نگرفته و مطالعه‌های محدود یاد شده، صرفاً بر روی بیماران دارای اختلالات مشخصی مانند گلانزمن و برنارد سولیر بوده است.

رازجو و همکاران در سال ۱۳۸۰، پرونده ۳۴۲ بیمار مبتلا به گلانزمن را که در طی ۲۱ سال به آزمایشگاه انعقاد سازمان انتقال خون ایران مراجعه کرده بودند، جهت ارزیابی‌های بالینی و آزمایشگاهی بررسی نمودند.<sup>(۸)</sup> تعداد و شکل طبیعی پلاکت‌ها، پاسخ طبیعی به ریستوستین به همراه طولانی بودن زمان خون‌روی(BT) در همه بیماران و کاهش پاسخ به کلژن، ADP و ترومیبن را در اغلب بیماران مورد تأکید قرار دادند و چنین نتیجه‌گیری کردند که با توجه به شیوع ازدواج‌های فامیلی در ایران، گلانزمن یک بیماری نادر در کشور محسوب نمی‌شود. تعداد بیماران مذکور در این مطالعه ۱۶٪ بیش از بیماران مونث بود و والدین ۹۰٪ بیماران نیز خویشاوند بودند. خونریزی‌های مخاطی و اکیموز، علامت بالینی عمدی در بیماران محسوب می‌شد.

در مطالعه افراسیابی و همکاران در سال ۱۳۸۶، سه خانواده ایرانی(۷ بیمار) مبتلا به سندروم برنارد سولیر از جنوب ایران، از نظر بروز کمپلکس گلیکوپروتئینی GP Ib/IX/Ib بررسی شدند.<sup>(۱۰)</sup> این افراد دریافتند که کمپلکس یاد شده در ۶ مورد کمتر از ۲٪ و به میزان ۱۲٪ در یک مورد دیگر است. با بررسی‌های ژنتیکی

اما در این مطالعه، از ۹ بیمار گلانزمن تنها والدین ۳ بیمار و از ۴ بیمار برنارد سولیر نیز والدین ۳ بیمار با هم خویشاوندی نزدیک داشتند(۱۱-۸). بنابراین برای تعیین شیوع این اختلالات در ایران، باید بررسی‌های جامع و دقیقی از بیماران سراسر کشور را توسط ترکیبی از آزمون‌های تجمع، ترشح و بررسی‌های فلوسیتوتمتری در دستور کار قرار داد.

اختلالات اکتسابی پلاکت‌ها، درصد قابل توجهی از ناهنجاری‌های عملکردی پلاکت‌ها را تشکیل می‌دهند.<sup>(۲)</sup> علی‌رغم این موضوع، به نظر می‌رسد که اختلالات اکتسابی، سهم قابل توجهی را از عملکرد مغایب پلاکت‌ها در مطالعه حاضر نداشتند. در این پژوهش با اخذ شرح حال از همه افراد مراجعه کننده، مشخص شد که ۹ بیمار داروهای NSAIDs، ۳ بیمار آسپیرین، یک بیمار پلاویکس و یک بیمار هم به طور هم زمان آسپیرین و پلاویکس مصرف می‌کردند. از میان این ۱۴ بیمار، ۲ بیمار مصرف کننده آسپیرین و یک بیمار مصرف کننده ایبوپرو芬 و به طور کلی ۱/۵٪ بیماران مراجعه کننده، در آزمون تجمع پلاکتی پاسخ غیر طبیعی به ویژه در مقابل اسید آراشیدونیک نشان دادند. در واقع از میان ۱۴ بیماری که داروهای ضد پلاکتی مصرف می‌کردند، ۱۱ بیمار و به عبارت دیگر ۷۹٪ این افراد فاقد الگوی غیر طبیعی تجمع پلاکتی بودند. به نظر می‌رسد که در بیشتر افراد دارای تجمع پلاکتی طبیعی، مصرف دارو در زمانی بوده است که بر روی عملکرد پلاکت‌ها اثری نداشته است(به عنوان مثال بیش از یک هفته قبل از انجام آزمایش).

هیچ توافقی بر سر این که از چه روشی برای انجام و تفسیر آزمون‌های تجمع و ترشح پلاکتی استفاده شود و نیز از چه غلطی از آگونیست در هر آزمایش استفاده گردد وجود ندارد(۲۱-۱۹، ۱۳، ۷، ۲). در پژوهش حاضر با توجه به بررسی منابع مختلف، غلظت ADP از سطح  $\mu\text{Mol/L}$  ۵ شروع شده و بیمارانی که به این غلظت پاسخ نمی‌دادند، با غلظت‌های  $\mu\text{Mol/L}$  ۱۰ و  $\mu\text{Mol/L}$  ۲۰ نیز بررسی گردیدند. معیار طبیعی یا غیر طبیعی بودن پاسخ بیماران به ADP، بر اساس میزان پاسخ‌دهی به دوز  $\mu\text{Mol/L}$  ۵ در مقایسه با نمونه‌های کنترل افراد سالم بود. در

می توان در پژوهش های آتی با ترکیب آگونیست های متعدد دیگر به همراه بررسی های مولکولی و فراساختاری پلاکت ها، به اختلال دقیق تر بیماران مانند نقص در مسیر ساخت ترومبوکسان، اختلال در مسیر پیام رسانی پلاکت ها و یا نقص در پروتئین های ساختاری پلاکت پی برد.

اختلال پلاکتی به دلیل آفیرینوژنی نیز در یک بیمار یافت شد. بیماران فاقد فیرینوژن قادر به تجمع پلاکت ها نمی باشند. این موضوع بیانگر اهمیت فیرینوژن در ایجاد تجمع پلاکتی در درون بدن می باشد. به نظر می رسد که اختلال تجمع پلاکتی به دلیل کمبود و یا نبود فیرینوژن پدیده نادری باشد، اما برای اثبات این موضوع لازم است حجم بیشتری از بیماران مختلف مورد بررسی قرار بگیرند. در ۱۶ بیمار (۸/۲٪) با وجود ترومبوسیتوپنی، پاسخ پلاکت ها در آزمون تجمع پلاکتی طبیعی بود که نشان دهنده عملکرد طبیعی پلاکت ها در این بیماران می باشد.

در شمار قابل توجهی از مراجعه کنندگان یعنی ۱۰۵ مورد (۵۳/۸۵٪)، پلاکت ها هم از نظر کمی (شمارش) و هم کیفی (تجمع) طبیعی بودند. درجه خونریزی بر اساس معیارهای توزن تو، در ۷۹٪ بیماران مذکور کمتر از ۳ بود. هم چنین به طور کلی درجه خونریزی در ۷۷٪ جامعه بیماران مورد بررسی (۱۵۰/۱۹۵) نیز کمتر از ۳ بود. این موضوع بیانگر این است که اغلب بیماران مراجعه کننده به این مرکز، مشکل خونریزی دهنده جدی نداشتند. بنابراین لازم است که درخواست آزمون تجمع پلاکتی برای بیماران از سوی پزشکان معالج با تجدید نظر بیشتری صورت گرفته و به طور اساسی هدفمند و تعدیل شود.

### نتیجه گیری

به دلیل این که تاکنون هیچ توافقی بر روی روش انجام، استانداردسازی و گزارش آزمون های عملکرد پلاکتی در دنیا وجود ندارد، تفسیر و مقایسه این آزمون ها بین آزمایشگاه های مختلف ناممکن خواهد بود. هر چند ایجاد یک روش بین المللی ضرورت دارد، اما قبل از آن باید تلاش شود که یک روش واحد و استاندارد کشوری و یا دست کم درون آزمایشگاهی برای بررسی و تفسیر مطالعه های تجمع و ترشح پلاکتی ایجاد گردد.

مشخص شد که جهش بد معنی (missense) > Ser (GP IX Phe insertion) در دو خانواده و یک جاگذاری (GP 1BA C3221 ins) در زن GP Ibα در خانواده سوم وجود دارد. در میان اعضای خانواده های مورد بررسی نیز چندین مورد هتروزیگوت مشاهده کردند.

فارسی نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۰، ۱۲۳ بیمار گلانزمن ایرانی را از نظر گلیکوپروتئین سطحی GP IIb/IIIa با استفاده از فلوسیتومتری مورد بررسی قرار دادند و بیماران را با توجه به شدت عالیم خونریزی دسته بندی کرده و دریافتند که گلانزمن تیپ I (نبود GP IIb/IIIa) شایع ترین نوع در ایران است، به طوری که ۷۵٪ بیماران را تشکیل می دهد (۱۱). ۱۶٪ بیماران در تیپ II (دارای کاهش GP IIb/IIIa) و ۰.۶٪ در گروه واریان گلانزمن (ناتوانی GP IIb/IIIa در اتصال به فیرینوژن) جای گرفتند.

نوشتار حاضر نخستین گزارش بررسی اولیه و همزمان تجمع و ترشح پلاکتی در بیماران مراجعه کننده مبتلا به اختلالات خونریزی دهنده در ایران می باشد.

به طور کلی در دنیا شیوع اختلالات عملکردی پلاکتی و از جمله اختلالات ترشحی به وضوح مشخص نشده است، اگر چه به نظر می رسد که اختلالات مربوط به ترشح و نیز انتقال پیام پلاکتی شایع تر از دیگر اختلالات باشد (۲۲-۲۴). به دلیل محدودیت تهیه مواد لومی نسانس، امكان بررسی همه بیماران مشکوک به اختلال ترشح پلاکتی محدود نبود و تنها ۱۳ بیمار (۶/۷٪) که واکنش برگشت پذیر به آگونیست ها نشان دادند، مورد بررسی رهاسازی ATP قرار گرفتند که همه این افراد اختلال ترشح را نشان دادند. بنابراین جامعه هدف مطالعه در این زمینه کافی نبوده و برای ارزیابی دقیق میزان شیوع اختلالات ترشحی، نیاز به بررسی گروه هدف وسیع تری وجود دارد.

اختلال دسته بندی نشده عملکردی پلاکت ها در ۴۴ بیمار (۲۲/۶٪) از مجموع ۹۰ بیمار مبتلا به اختلال عملکرد پلاکتی دیده شد. این بیماران شامل بیمارانی می شدند که به یک یا چند آگونیست مورد استفاده در این پژوهش پاسخ کمتر از حداقل میزان قابل قبول در افراد طبیعی دادند. درجه خونریزی در ۶۶٪ این بیماران بر اساس معیارهای توزن تو کمتر از ۳ بود.

طور دقیق‌تری بتوانیم اختلالات مختلف عملکرد پلاکتی مانند نقص در مسیر ساخت اسید آراشیدونیک و ترومبوکسان، اختلالات پیامدهی و یا اختلالات گیرنده‌های پلاکتی و دیگر اختلالات عملکردی را از هم تفکیک نماییم.

### تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از خانم دکتر مهتاب مقصودلو به خاطر مشاوره در زمینه SPSS اعلام می‌دارد.

با توجه به درصد بالای افراد دارای پاسخ طبیعی به آزمون تجمع پلاکتی در بیماران مورد بررسی، توصیه می‌شود که انتخاب گروه هدف بیماران توسط پزشکان معالج با دقت و بررسی بیشتری صورت پذیرد. این امر از اتفاق وقت و هزینه آزمایشگاه و نیز تخمین بالاتر بیماران خوب‌تری دهنده مبتلا به اختلالات عملکرد پلاکتی در کشور جلوگیری می‌کند.

ما در نظر داریم که بسته به امکانات سازمان، در پژوهش‌های بعدی پانل آگونیستی مورد استفاده در آزمون‌های عملکرد پلاکتی را گسترش دهیم. این امر به ما کمک می‌کند که بسته به نوع آگونیست مورد استفاده، به

### References:

- 1- Hayward CP. Diagnostic approach to platelet function disorders. *Transfus Apheresis Sci* 2008; 38(1): 65-76.
- 2- Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma : description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 2005; 123(2): 172-83.
- 3- Hayward CP, Eikelboom J. Platelet function testing: quality assurance. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(3): 273-82.
- 4- Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC. Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest* 1977; 60(4): 866-73.
- 5- Clinical and Laboratory Standards Institute. Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved Guideline. Available from: [http://shopping.netsuite.com/c.1253739/site/Sample\\_pdf/H58A\\_sample.pdf](http://shopping.netsuite.com/c.1253739/site/Sample_pdf/H58A_sample.pdf).
- 6- White MM, Foust JT, Mauer AM, Robertson JT, Jennings LK. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories. *Thromb Haemost* 1992; 67(5): 572-7.
- 7- Hayward CP. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev* 2011; 25(4): 169-73.
- 8- Razjou F. Glanzmann's thrombasthenia in Iran. *Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 2001; 5(2): 52-8. [Article in Farsi]
- 9- Shams Asanjan K. A survey on platelet surface glycoproteins in patients with Bernard-Soulier syndrome by flowcytometry . *Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 2005; 8(4): 21-6. [Article in Farsi]
- 10- Afrasiabi A, Lecchi A, Artoni A, Karimi M, Ashouri E, Peyvandi F, et al. Genetic characterization of patients with Bernard-Soulier syndrome and their relatives from Southern Iran. *Platelets* 2007; 18(6): 409-13.
- 11- Farsinejad A, Abolghasemi H, Kazemi A, Aghaiipour M, Hadjati E, Faranoush M, et al. Classification of Iranian patients with Glanzmann's Thrombasthenia using a flow cytometric method. *Platelets* 2011; 22(5): 321-7.
- 12- Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. *Blood Rev* 2007;21(2): 89-97.
- 13- D'Andrea G, Chetta M, Margaglione M. Inherited platelet disorders: thrombocytopenias and thrombocytopathies. *Blood transfuse* 2009; 7(4): 278-92.
- 14- Khanduri U, Pulimood R, Sudarsanam A, Carman RH, Jadhav M, Pereira S. Glanzmann's thrombasthenia. A review and report of 42 cases from South India. *Thromb Haemost* 1981; 46(4): 717-21.
- 15- Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 10.
- 16- Seligsohn U, Rososhansky S. A Glanzmann's thrombasthenia cluster among Iraqi Jews in Israel. *Thromb Haemost* 1984; 52(3): 230-1.
- 17- Awidi AS. Increased incidence of Glanzmann's thrombasthenia in Jordan as compared with Scandinavia. *Scand J Haematol* 1983; 30(3): 218-22.
- 18- Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic parous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 46.
- 19- Hayward CP. Inherited platelet disorders. *Curr Opin Hematol* 2003; 10(5): 362-8.
- 20- Harrison P. Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol* 2000; 111(3): 733-44.
- 21- Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Nichols WL, Hayward CP ; North American Specialized Coagulation Laboratory Association. Variability in clinical laboratory practice in testing for disorders of platelet function: results of two surveys of the North America Specialized Coagulation Laboratory Association. *Thromb Haemost* 2005; 93(3): 549-53.
- 22- Rao Ak. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *J Thromb Haemost* 2003; 1(4): 671-81.
- 23- Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1628-36.
- 24- Santos XM, Bercaw-Pratt JL, Yee DL, Dietrich JE. Recurrent menorrhagia in an adolescent with a platelet secretion defect. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2001; 14(2): e35-8.

**Original Article**

## **The prevalence of platelet function defects in patients referred to the special reference coagulation laboratory of Iranian Blood Transfusion Organization**

**Rajabi A.<sup>1</sup>, Ahmadinejad M.<sup>1</sup>, Mashkooli M.<sup>1</sup>, Tabatabaei S.M.R.<sup>1</sup>, Seyed Mortaz S.L.<sup>1</sup>, Ran-Balooch S.<sup>1</sup>, Moazezi Nekoui-Asl S.S.<sup>1</sup>, Mokhtari Z.<sup>1</sup>, Mojtabavi Naeini M.<sup>1</sup>**

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

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

Platelet function disorders are common in the world population but in our country except for severe cases, they are not well investigated due to limited diagnostic tools. In recent two years we aimed to assess platelet function tests in referral patients suspected of platelet function disorders, in the special reference coagulation laboratory of Iranian Blood Transfusion Organization, as the center equipped with lumi-aggregometer.

#### **Materials and Methods**

We have investigated 195 referral patients during a seven-month period, from November 2011 to May 2012, for platelet aggregation and ATP release response for highly suspected patients with four platelet agonists ADP, collagen, arachidonic acid and ristocetin and a luciferin-luciferase reagent. Results were analyzed by SPSS version 16.

#### **Results**

Among 195 referred patients, 90 cases (46.1%) had an abnormality in platelet count or function. Abnormal cases fall within the categories of low platelet count with normal function (8.2%), ATP release (secretion) defect (6.7%), Glanzman's thrombastenia (4.6%), Bernard Solier Syndrome (2%), acquired platelet defect (1.5%), afibrinogenemia (0.5%), and uncategorized platelet function disorders (22.6%). The other 105 remaining patients showed a quiet normal result.

#### **Conclusions**

The present study is the first simultaneous analysis of platelet function and secretion disorders. In order to guess the true prevalence of these disorders, more wider and comprehensive studies, the use of more complete panels of agonists and ATP release assessment in all patients with an abnormal aggregometry pattern have been suggested for future studies.

**Key words:** Blood Platelet Disorders, Platelet Function Tests, Platelet Aggregation, Bernard-Soulier Syndrome, Thrombasthenia

*Received: 7 May 2013*

*Accepted: 11 Aug 2013*

**Correspondence:** Ahmadinejad M., MD. Pathologist. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.  
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88212459; Fax: (+9821) 88601555  
E-mail: minoam26@yahoo.com