تاثیر فیلتراسیون پیش از ذخیره کردن بر فعال شدن پلاکت‌ها در فراورده‌های پلاکتی

*علی سلیمانی فریزهندی I
دکتر مهناز آقایی‌پور II
دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله III

چکیده

شرایط آماده کردن و نگه‌داری پلاکت جهت تزریق می‌تواند سبب فعال شدن پلاکت شود که این امر موجب کاهش توانایی عملکرد پلاکت‌های ذخیره شده نسبت به پلاکت‌های تازه تهیه شده و حیات آن در محیط زنده بیولوژیک بعد از تزریق می‌گردد. در این مطالعه با استفاده از فلوسیتومتری، شاخص‌های غشایی CD۶۳ و CD۶۲P در فراورده‌های پلاکتی که برای ۳ روز تحت شرایط استاندارد بانک خون تهیه شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. کاهش لکوسیت قبل از تزریق در پلاکت‌ها روشی معمول در مراکز انتقال خون، برای جلوگیری از عوارض ناشی از گلبول‌های سفید می‌باشد. در این مطالعه ۲۴ واحد پلاکت به صورت پلاسمای غنی از پلاکت تهیه شد سپس توسط فیلتر LRP۱۰SE-Pall محصولی که لکوسیت آن کاهش یافته بود تهیه گردید و فراورده‌های پلاکتی فیلتر شده و فیلتر نشده از نظر میزان اسیدیته و شاخص‌های CD۶۳ و CD۶۲P مورد مقایسه قرار گرفتند. در طی ۳ روز نگه‌داری، واحدهای لکوسیت کاهش یافته در مقایسه با پلاکت‌هایی که به صورت معمولی تهیه شده بودند، هیچ اختلاف معنی‌داری را در میزان اسیدیته نشان ندادند($P>0/05$). در طی ۳ روز نگه‌داری(روزهای ۱و ۳) واحدهای پلاکتی که لکوسیت آن‌ها کاهش یافته بود، کاهشی را در میزان شاخص‌های CD۶۳ و CD۶۲P در مقایسه با محصولاتی که به صورت معمولی تهیه شده بود، نشان دادند($P<0/05$).فیلتراسیون پلاکت‌ها ممکن است عاملی در جهت فعال شدن آن‌ها محسوب گردد که این امر ناشی از تماس مستقیم با فیلترها می‌باشد. از سوی دیگر فیلتراسیون پیش از ذخیره و حذف گلبول‌های سفید نیز ممکن است سبب کاهش فعال شدن پلاکت‌ها و در نتیجه حفظ عملکرد پلاکت‌ها شود. این مطالعات نشان داد که فیلتراسیون سبب فعال شدن پلاکت‌ها نمی‌شود و شاخص‌های CD۶۳ و CD۶۲P، می‌توانند به عنوان مفیدترین ابزار جهت ارزیابی کیفی محصولات پلاکتی مورد استفاده قرار گیرند. در واقع هدف از این پژوهش بررسی تاثیر فیلتراسیون پیش از ذخیره کردن بر فعال شدن پلاکت‌ها در فراورده‌های پلاکتی بوده است.

کلیدواژه‌ها: ۱ – فیلتراسیون پیش از ذخیره ۲ – پلاسمای غنی از پلاکت ۳ – CD۶۲P،CD۶۳

مقدمه

تزریق پلاکت در بیمارانی که از بیماری‌های خونی یا سرطان رنج می‌برند، ابزاری مهم برای پایدار کردن سیستم انعقادی آن‌ها می‌باشد.

تزریق این محصول می‌تواند عوارضی را به دنبال داشته باشد که شامل آلوایمونیزاسیون نسبت به آنتی‌ژن‌های سازگار نسجی نوع ۱(HLA-I)، آنتی‌ژن‌های پلاکتی، مقاومت

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان نامه علی سلیمانی فریزهندی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد خون‌شناسی به راهنمایی دکتر مهناز آقایی‌پور و مشاوره دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله، سال ۱۳۸۲. هم‌چنین این مطالعه تحت حمایت مالی سازمان انتقال خون انجام شده است.

I) کارشناس ارشد خون‌شناسی، سازمان انتقال خون، بزرگراه همت. تهران.(*مولف مسئول)
II) متخصص آسیب‌شناسی، سازمان انتقال خون، بزرگراه همت. تهران.
III) دانشیار گروه ایمنی‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، بزرگراه جلال‌آل‌احمد، تهران.

www.SID.ir

درمانی به پلاکت(Platelet Refractoriness)، واکنش‌های تب‌زای غیرهمولیتیک و انتقال عوامل ویروسی به ویژه ویروس سیتومگال(CMV) می‌باشند.[۱و۲] مطالعات اخیر نشان داده‌اند که گلبول‌های سفید در ایجاد عوامل ذکر شده نقش مهمی را ایفا می‌کنند بنابراین استفاده از محصولات لکوسیت کاهش یافته به عنوان راه‌کاری مناسب برای کاهش عوارض گلبول‌های سفید به کار برده شده است. با توجه به روش‌های کاهش لکوسیتی، استفاده از فیلترهای کاهنده لکوسیتی به عنوان موثرترین ابزار جهت کاهش گلبول‌های سفید در نظر گرفته شده است. عمل فیلتراسیون می‌تواند به صورت پیش از ذخیره یا بعد از ذخیره انجام شود[۳] اما فیلتراسیون پیش از ذخیره دارای مزایایی نسبت به فیلتراسیون بعد از ذخیره می‌باشد به طوری که با فیلتراسیون پیش از ذخیره می‌توان شکسته‌شدن گلبول‌های سفید و تولید سیتوکین‌های مهمی مانند IL-۱، IL-٦ را طی مدت نگه‌داری کاهش داد در صورتی که با فیلتراسیون بعد از ذخیره نمی‌توان روند ایجاد این عوامل را کاهش داد.[٤-۷] از سوی دیگر بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که فیلتراسیون اثر منفی روی فعالیت پلاکت‌ها دارد به طوری که تماس فیزیکی بین فیلترها و پلاکت‌ها سبب فعال شدن پلاکت‌ها شده و در نهایت حیات و عمل‌کرد آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد[۸-۱۱] بنابراین ارزیابی کیفی محصول پلاکتی(پلاسمای غنی از پلاکت) از نظر شاخص‌های فعال شدن(CD٦٣ و CD٦٢P) جهت پی بردن به اثر عمل فیلتراسیون بر فعال شدن پلاکت‌ها از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد.[۱۲-۱٤] به همین علت در مطالعه حاضر تاثیر فیلتری از نوع IN-LINE بر فعال شدن پلاکت‌ها در فراورده پلاکتی(پلاسمای غنی از پلاکت) مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص گردد که آیا تماس پلاکت‌ها با این فیلترها می‌تواند سبب فعال شدن آن‌ها گردد یا این که اثر قابل توجهی بر فعال شدن آن‌ها ندارد.

روش بررسی

در این مطالعه از ٢٤ داوطلب که جهت اهدای خون به پایگاه مرکزی انتقال خون واقع در تهران، مراجعه کرده بودند، ٤٥٠ میلی‌لیتر خون کامل(Whole blood) در کیسه‌های ۳تایی(Baxter SA ،La chater ،France) حاوی ٦٣ میلی‌لیتر ضد انعقاد CPDA(Adenine، Dextrose، Phosphate، Citrate) گرفته شد. کیسه‌ها بعد از ٤ ساعت نگه‌داری در درجه حرارت آزمایشگاه توسط سانتریفوژ (VA، Winchester ،Inc ،Jouan) با سرعت g۱۲۰۰ به مدت ٥ دقیقه سانتریفوژ شدند و پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet Rich Plasma) به کیسه جانبی انتقال داده شد سپس با دور g۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید که در نتیجه آن پلاکت به صورت فشرده شده در کیسه باقی ماند و پلاسمای بدون پلاکت (Platelet Poor Plasma) که روی آن قرار داشت، توسط دستگاه اکستراتور به کیسه دیگری انتقال داده شد. در نهایت محصول پلاکتی به صورت فشرده شده یا کنسانتره (Platelet Concentrate) با حجم ۷٥ میلی‌لیتر به دست آمد سپس توسط اتصال فیلتر (LRP۱۰SE-Pall ،England) به کیسه پلاکتی، نیمی از محصول از فیلتر عبور داده شد و نیمی دیگر در کیسه اصلی باقی ماند. در نتیجه از هر واحد پلاکت فشرده شده ۲ واحد محصول پلاکتی به دست آمد(فیلتر و غیر فیلتر شده). تمام محصولات در دستگاه تکان‌خور افقی (Horizontal Agitator) با سرعت ٦٠ چرخش در دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگه‌داری گردید.

قبل از نمونه‌برداری در صورت وجود فراورده‌ای داخل سگمانت‌های کیسه، محتویات آن به داخل کیسه انتقال داده می‌شد و کیسه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی مخلوط می‌شدند(کیسه فیلتر و غیر فیلتر شده). در مرحله بعد از ۳ سانتی‌متری بالای محلی که از قبل توسط سیلر مسدود شده بود(از سگمانت‌ها کیسه) با قیچی استریل برشی داده شد و پس از برداشتن ۱ میلی‌لیتر پلاکت از کیسه‌ها به داخل لوله‌های پلاستیکی ۱ بار مصرف منتقل گردید سپس ۳ سانتی‌متر بالاتر از محل برش، سگمانت مربوط توسط سیلر مسدود شد. عمل نمونه‌برداری در روزهای صفر، ۱و ۳ صورت گرفت. در طی این مدت، فراورده پلاکتی روی شیکر

Archive of SID
www.SID.ir

قرار داده شد. نمونه‌ها از نظر شمارش پلاکت، میزان اسیدیته(pH) وگلیکوپروتئین‌های CD۶۳ و CD۶۲P مورد ارزیابی قرار گرفت. برای شمارش پلاکت و اندازه‌گیری میزان اسیدیته ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر پلاکت برداشته شد و به داخل یک لوله پلاستیکی منتقل گردید سپس ۹/۹ میلی‌لیتر از اگزالات آمونیوم ۱٪ به آن اضافه شد تا نمونه‌ای با رقت ۱/۱۰۰ به دست آید. در مرحله بعد پس از مخلوط کردن به آرامی به مدت ۵ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از آن، روی لام نئوبار ریخته شد و لامل سنگی روی آن گذاشته شد و در داخل ظرفی مرطوب به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. لام نئوبار توسط میکروسکوپ نوری شمارش شد و از طریق فرمول: تعداد پلاکت(میکرولیتر)=میانگین شمارش شده × ضریب تصحیح رقت × ضریب تصحیح حجم، تعداد پلاکت‌ها محاسبه گردید. هم‌چنین برای تعیین اسیدیته نمونه مورد نظر، دستگاه pH متر در محدوده اسیدیته‌های ٤ و ٧ قرار داده شد بدین منظور ابتدا دستگاه قبل از آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه روشن شد تا دمای کالیبراسیون آن به دمای آزمایشگاه برسد سپس با استفاده از کالیبراتورهایی که در محدوده اسیدیته ٤ و ٧ قرار داشتند دستگاه مورد نظر کالیبره شد و در نهایت pH متر برای اندازه‌گیری نمونه‌ها آماده گردید. این عمل هر روز قبل از انجام دادن هر گونه آزمایشی صورت می‌گرفت.

جهت بررسی گلیکوپروتئین‌های CD۶۳ و CD۶۲P از هر محصول پلاکتی که به ۲ قسمت تقسیم شده بود(فیلتر و غیرفیلتر شده) در روزهای مشخص، صفر، ۱ و ۳ مقدار ۱ میلی‌لیتر نمونه در زیر هود بیولوژیک برداشته شد تا آلودگی باکتریایی محیطی موجب بروز تغییراتی در عمل‌کرد پلاکت‌ها نشود. از نمونه‌های به دست آمده ۵۰۰ میکرولیتر برداشته شده و در لوله‌های پلاستیکی ۱ بار مصرف ریخته می‌شد و پس از اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات(PBS) با سرعت g۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌گردید. بعد از پایان سانتریفوژ و خالی کردن محلول رویی، پلاکت ته‌نشین شده به آرامی تکان داده می‌شد تا به صورت یکنواخت در آید. پس از ۲ نوبت شست‌وشو، مرحله سوم شست‌وشو با بافر پارافرم آلدئید ۱٪ انجام می‌گردید(با همان سرعت و شرایط) سپس با خالی کردن محلول رویی، با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات، سوسپانسیون یکنواخت پلاکتی به دست می‌آمد. از سوسپانسیون به دست آمده، شمارش سلولی از نظر تعداد پلاکت صورت می‌گرفت.

با توجه به این که برای عمل فلوسیتومتری 10^6 سلول مورد نیاز می‌باشد. از سوسپانسیون به دست آمد رقتی مناسب، براساس تعداد پلاکت موجود تهیه می‌شد تا تعداد سلول مورد نیاز به دست آید. به عنوان مثال اگر تعداد پلاکت در سوسپانسیون به دست آمده 50×10^6 باشد باید آن را ۱/۵۰ رقیق کرد تا 10^6 سلول حاصل شود.

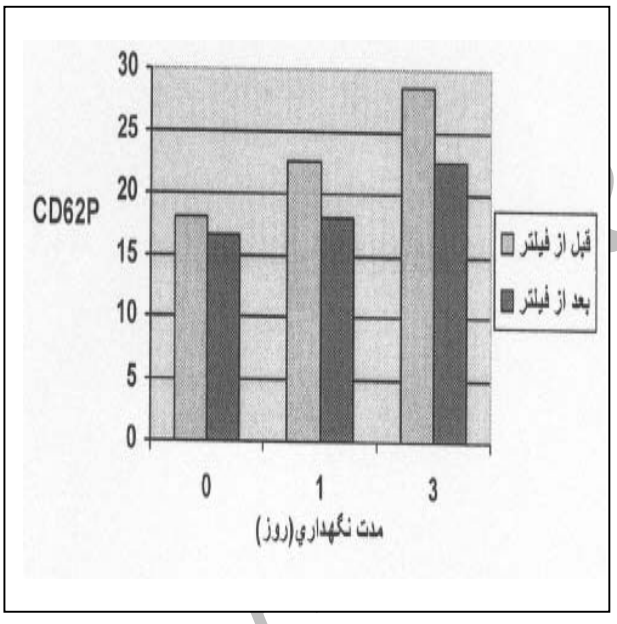
برای رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری 10^6 سلول پلاکت در تماس با ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی‌های مونوکلنال کنژوگه قرار می‌گرفت بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از پلاکت آماده شده(نمونه‌های فیلتر و غیرفیلتر شده) به داخل ۳ لوله پلاستیکی انتقال داده می‌شد و پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر BSA٪۲+PBS به لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده می‌شد سپس ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی‌های CD۶۳(MHCD۶۲۰۰، CD۶۲P-PE(Calta، M۳f۲aPIT)، IgG۱-PE/FITC(Caltage، MHCD۶۳۰۱)، FITC(Caltage، MHCD۶۳۰۱) جداگانه به هر لوله اضافه می‌گردید. پس از قرار گرفتن لوله‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی به تمام لوله‌ها ۷۰ میکرولیتر پارافرم آلدئید ۰/۵٪ اضافه می‌شد و نمونه‌ها جهت فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. در این ارزیابی آنتی‌بادی IgG۱-PE/FITC به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. عمل فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه داکو با Partec-PAS-III انجام شد. برای انجام دادن فلوسیتومتری ابتدا دستگاه قبل از عملیات آنالیز به مدت ۳۰ دقیقه روشن شد سپس لامپ دستگاه در محدوده نور لیز قرار داده شد. پس از ۳ نوبت شست‌وشوی دستگاه با آب مقطر و سرم فیزیولوژیک نرمال(به طوری که هیچ گونه ذرات سلولی در ناحیه FSC، SSC مشاهده نشود)، سرعت شمارش سلولی دستگاه در محدوده ۳ قرار داده شد(سرعت شمارش بالا باعث از دست دادن سلول‌ها یا انسداد مجرای شمارش کننده

Archive of SID
www.SID.ir

توسط مجموعه‌های پلاکتی می‌گردد). برای مشخص کردن چگونگی وضعیت سلولی و ارزیابی FL۲، FL۱، SSC، FSC نمودارها در وضعیت خطی ـ خطی برای SSC، FSC و لگاریتمی ـ لگاریتمی برای(FL۲، FL۱) قرار داده شد. هم‌چنین ولتاژهای مورد استفاده برای بررسی SSC، FSC، FL۲، FL۱ به ترتیب در محدوده ۳۷۰، ٤٥٠، ۲۹٥ و ۳۰۰ در نظر گرفته شد. پس از آماده شدن نمونه‌ها و ریختن آن‌ها داخل لوله مخصوص فلوسیتومتری، به دستگاه داده شد تا وضعیت سلولی در ناحیه‌ایی که مشخصه پلاکت‌ها است با استفاده از شاخص CD٦١ که در واقع برای پلاکت‌ها اختصاصی می‌باشد، فراوانی و هم‌گونی سلولی در آن ناحیه مشخص گردد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه نرم‌افزاری PEPI-Version٤ ۲۰۰۱ و از t-Test برای ارزیابی تاثیر متغیر فیلتر روی شاخص‌های CD٦٣ و CD٦٢P و برای بررسی روند افزایش شاخص‌های ذکر شده طی مدت نگه‌داری از Paired t-Test استفاده شد. فاصله اطمینان به کار رفته در بررسی آزمایش‌ها در محدوده ۹٥٪ بود.

نتایج

تعداد پلاکت شمارش شده و میزان pH در محصولات فیلتر و غیر فیلتر شده طی مدت نگه‌داری(صفر، ۳، ۱) در جدول شماره ۱ آورده شده است. دو شاخص مهم CD٦٣ و CD٦٢P به دنبال فعال شدن پلاکت روی سطح آن‌ها افزایش می‌یابد که در مطالعه حاضر وجود این شاخص‌ها روی پلاکت‌های فیلتر شده و غیر فیلتر مورد بررسی قرار گرفته است. بدین ترتیب که میزان بیان شاخص CD٦٢P در نمونه‌های قبل از فیلتراسیون در روزهای صفر، ۱ و ۳ به ترتیب ۷/۷±۱۷/۹۳ و ۸/۸۱±۲۲/٥٥ و ۹/۸±٥۷، ۲۸٪ به دست آمد. شاخص CD٦٢P بعد از ۳ روز(۳/۳±۱۰/٦٤٪) نسبت به روز صفر افزایش یافته بود(P<۰/۰٥). بروز CD٦٢P در نمونه‌های بعد از فیلتراسیون نیز در روزهای صفر، ۱و ۳ به ترتیب ۷/٦±۱٦/٦ و ۸±۱۷/۹٥٪ و ۸/۳±۲۲/٦٪ به دست آمد که بعد از ۳ روز به میزان ۳±٦٪ افزایش یافته بود(P<۰/۰٥). از سوی دیگر میزان CD٦٢P در نمونه‌های فیلتر شده نسبت به غیرفیلتره کاهش درصدی را در روزهای صفر، ۱و ۳ نشان داد که این کاهش، در روز صفر از نظر آماری معنی‌دار نبود(P>۰/۰٥) اما در روز سوم این تغییر معنی‌دار بوده است(P<۰/۰٥). تغییرات بیان CD٦٢P در نمونه‌های قبل و بعد از فیلتراسیون در طی مدت نگه‌داری در نمودار شماره ۱ آورده شده است.



نمودار شماره ۱- مقایسه فعال شدن پلاکت‌ها از نظر شاخص CD٦٢ بعد و قبل از فیلتراسیون در طی مدت نگه‌داری

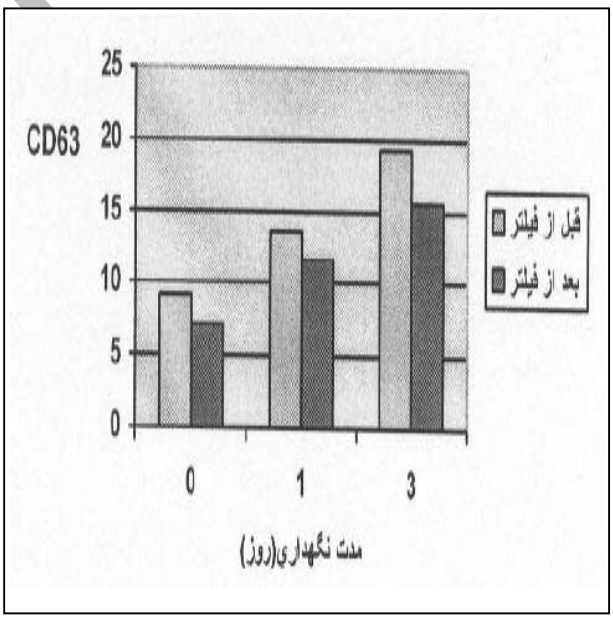
جدول شماره ۱- بررسی شمارش پلاکت و میزان اسیدیته

روز	قبل از فیلتراسیون			بعد از فیلتراسیون		
	۰	۱	۳	۰	۱	۳
شمارش پلاکت $x10^{3}$ میکرولیتر	*٥/۹±۰/۷	٥/۸±۰/٦	*٥/۸±۰/٥	*٥/۷±۰/٥	٥/٦±۰/٤	*٥/٦±۰/٤
pH	**۷/٤۹±۰/۰۷٥	۷/٦٤±۰/۱٦	**۷/٤۱±۰/۱٤	**۷/٤۲±۰/۰۳٥	۷/٤۹±۰/۱۸٥	**۷/٤۱±۰/۲

تعداد پلاکت و pH در طی ۳ روز نسبت به روز صفر مقایسه شده است.میانگین ±انحراف استاندارد، **معنی‌دار نمی‌باشد(P>۰/۰٥)، *معنی‌دار می‌باشد(P<۰/۰٥)، تعداد=۲٤

www.SID.ir

همچنین شاخص CD۶۳ در نمونه‌های قبل از فیلتراسیون در طی مدت نگه‌داری به ترتیب ۲/۹۵±۹/۱۴٪، ۲/۲±۱۳/۶۱٪ و ۳/۷۳±۱۹/۴٪ بوده است. این افزایش درصد شاخص مورد نظر در طی ۳ روز نسبت به روز صفر از نظر آماری معنی‌دار بود($P<0/05$). از سوی دیگر میزان شاخص CD۶۳ در نمونه‌های بعد از فیلتراسیون در روزهای صفر، ۱ و ۳ به ترتیب ۲/۶±۷/۰۵٪، ۳/۶۵±۱۱/۶۵٪ و ۳/۹±۱۵/۵۸٪ به دست آمد که این افزایش درصد بعد از ۳ روز نسبت به روز صفر از نظر آماری معنی‌دار بود($P<0/05$). براساس نتایج به دست آمده اختلاف درصد بیان شاخص CD۶۳ در نمونه‌های قبل و بعد از فیلتراسیون در روز صفر غیر قابل توجه و از نظر آماری معنی‌دار نبود($P>0/05$) اما این اختلاف در روز سوم معنی‌دار مشاهده شد($P<0/05$). تغییرات بیان CD۶۳ در نمونه‌های قبل و بعد از فیلتراسیون در طی مدت نگه‌داری در نمودار شماره ۲ آمده است. نتایج به دست آمده نیز در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲- مقایسه فعال شدن پلاکت‌ها از نظر شاخص CD۶۳ بعد و قبل از فیلتراسیون در طی مدت نگه‌داری

بحث

در دهه اخیر یکی از مهم‌ترین مواردی که در سازمان‌های انتقال خون مورد توجه قرار گرفته است به کارگیری کنترل کیفی به عنوان یک اصل در تهیه و تولید محصول می‌باشد این امر موجب ایجاد راه‌کارهای مناسب در جهت تولید فراورده‌های سالم می‌گردد. براساس استانداردهای FDA(سازمان دارو وغذا امریکا) فراورده خونی علاوه بر سالم بودن(Safe) باید دارای بازده درمانی بالا باشد. یکی از مهم‌ترین این محصولات فراورده پلاکتی می‌باشد. با توجه به عمل‌کرد مهم و حیاتی آن در بیمارانی که دچار کاهش پلاکتی شده‌اند، کنترل کیفی این محصول نیز دارای اهمیت خاص می‌باشد.[۱۵]

بدین منظور در تمام کشورهای توسعه یافته تغییرات نوین زیادی در جهت بالا بردن حساسیت آزمون‌های کیفیت فراورده‌های خونی به ویژه پلاکت بوجود آمده است تا با این عمل بتوان از فعالیت تمام عوامل مداخله‌گر که ممکن است کیفیت محصول پلاکتی را کاهش دهد، جلوگیری کرد. فرایندهای تهیه و جمع‌آوری و نگه‌داری در طی مدت ذخیره‌سازی می‌توانند تغییراتی را در خصوصیات غشایی، سیتوپلاسمی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن بوجود آورند.[۱۶-۱۸] یکی از مهم‌ترین این تغییرات فعال شدن پلاکت‌ها است که با توجه به این نکته همزمان با فعال شدن پلاکت، عمل‌کرد و حیات آن دچار تغییر می‌گردد و این تغییر برای فعالیت آن مناسب نمی‌باشد. در سال ۱۹۹۸ Green berg و همکارانش نشان دادند که در پلاکت‌هایی که فعال شده‌اند میزان اسید سیالیک غشا تغییر کرده است که این امر با پایین آمدن نیمه عمر و عمل‌کرد همراه است بنابراین یکی از آزمون‌های بررسی عمل‌کرد پلاکتی(Functional) بررسی فعال شدن آن‌ها می‌باشد.[۱۹و ۲۰]

جدول شماره ۲- بیان شاخص‌های فعال شدن در طی مدت نگه‌داری

روز	بعد از فیلتراسیون			قبل از فیلتراسیون		
	۰	۱	۳	۰	۱	۳
CD۶۲P٪	**۱۶/۶±۷/۶	*۱۷/۹۵±۸	*۲۲/۶±۸/۳	**۱۷/۹۳±۷/۷	*۲۲/۵۵±۸/۸۱	*۲۸/۵۷±۹/۸
CD۶۳٪	**۷/۰۵±۲/۶	*۱۱/۶۵±۳/۶۵	*۱۵/۵۸±۳/۹	**۹/۱۴±۰/۹۵	*۱۳/۶۱±۲/۲	*۱۹/۴±۳/۷۳

میانگین ±انحراف استاندارد، **معنی‌دار نمی‌باشد($P>0/05$)، *معنی‌دار می‌باشد($P<0/05$)، تعداد=۲۴

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به این که پلاکت توسط روش‌های مختلف فعال می‌گردد و شیوه فعال شدن آن‌ها به نوع عامل تحریکی بستگی دارد، باید روشی را در این رابطه انتخاب کنیم که از حساسیت بالایی برخوردار باشد. از میان آن‌ها روش فلوسیتومتری از حساسیت و درجه اختصاصی بودن مناسبی برخوردار می‌باشد.[۲۱-۲۴] بدین منظور در این مطالعه از ۲ شاخص مهم فعال شدن CD۶۳ و CD۶۲P برای ارزیابی فعال شدن پلاکت‌ها توسط روش فلوسیتومتری استفاده گردید. این پروتئین‌ها در حالت استراحت به میزان کم‌تر از ۱۰٪ در سطح آن‌ها وجود دارند و از جمله گلیکوپروتئین‌های داخل گرانولی و لیزوزومی هستند و زمانی که پلاکت در مرحله عملیاتی قرار می‌گیرد و محتویات خود را آزاد می‌کند این شاخص‌ها در سطح غشا بیان می‌شوند.

در مطالعه انجام شده توسط Hidoheiko و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان داده شد که میزان فعال شدن شاخص CD۶۳ از شاخص CD۶۲P در طی مدت نگه‌داری کم‌تر می‌باشد[۱۹] که این نتایج با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. علت کاهش تاخیر بیان CD۶۳ نسبت به CD۶۲P آن است که گرانول‌های لیزوزومی بر خلاف گرانول‌های آلفا بعد از فعال شدن، تمام محتویات خود را به طور کامل آزاد نمی‌کنند.

با توجه به این موضوع که در کشور ما روش متداول تهیه پلاکت به روش استاندارد یعنی دهنده ـ تصادفی (Random-Donor) به صورت پلاسمای غنی از پلاکت می‌باشد در این مطالعه نیز از روش فوق به عنوان روش پلاکتی برای بررسی فعالیت پلاکتی استفاده شد.

امروزه پیش‌رفت‌های زیادی در رابطه با فیلترهای کاهنده لکوسیتی از نظر مکانیسم‌های حذف لکوسیتی به وجود آمده است. از سوی دیگر بعضی از سازندگان آن‌ها برای بالا بردن کارایی این فیلترها، از مواد یا یون‌های سنتتیک باردار زیاد در فیبرهای آن‌ها استفاده می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که این مواد باردار می‌توانند عمل‌کرد پلاکتی را تحت تاثیر قرار دهند.[۲۵] این مسئله در فیلترهای کاهنده لکوسیتی که در فراورده‌های پلاکتی استفاده می‌شوند بیش‌تر به چشم می‌خورد زیرا این فیلترها طوری طراحی شده‌اند که فیبرهای فیلتر به پلاکت‌ها اجازه عبور داده اما مانع عبور گلبول‌های سفید می‌گردد که عامل مهم در این امر وجود مواد باردار می‌باشد.[۲۶]

Tielman و همکارانش در سال ۱۹۹۸ در ۱ مطالعه نشان دادند که سطح پلی‌آکریل‌آمینوفیبریل در فیبر فیلترها نقش مهمی در فعال شدن سیستم تماسی و غشایی پلاکت دارد. هم‌چنین پاسخ پلاکتی به آگونیست‌های محلول برای تجمع کاهش می‌یابد.[۹] بدیهی است که این سوال مطرح می‌شود که آیا این فیلتراسیون روی کیفیت فراورده فیلتر شده تاثیر منفی دارد یا خیر؟ بدین منظور در مطالعه حاضر پاسخ به این سوال مورد بررسی قرار گرفت. Bradly و همکارانش در سال ۱۹۹۹ در یک تحقیق تاثیر فیلتراسیون پیش از ذخیره بر فعالیت پلاکت‌ها را بررسی کردند که نتایج آن‌ها نشان دهنده آن بود که فیلتراسیون پیش از ذخیره می تواند تا حد قابل قبولی از افزایش روند فعال شدن پلاکت‌ها در طی مدت ذخیره‌سازی پیش‌گیری نماید.[۲۷]

در پژوهش حاضر فعال شدن پلاکت‌ها در آزمایشگاه (In-vitro) مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات به دست آمده نشان دهنده آن بود که فیلتراسیون قبل از ذخیره می‌تواند سرعت فعال شدن پلاکت‌ها در مدت نگه‌داری را کاهش دهد که این امر ناشی از حذف شدن میزان قابل قبولی از گلبول‌های سفید می‌باشد.

نوع کیسه پلاکتی، سرعت سانتریفوژ، دور تکان‌خورهای پلاکتی(هموشیکر)، در تمام محصولات یکسان بوده و تنها عامل متغیر در این بررسی وجود فیلتر و گلبول‌های سفید و عوامل مربوط به آن بوده است بنابراین تنها عامل موثر در اختلاف درصد شاخص‌های Activation می‌تواند ناشی از فیلتر باشد.[۲۸-۳۰]

در مطالعه حاضر کاهش اختلاف درصد بین پلاکت‌های فیلتر شده و غیر فیلتره در روز صفر مشاهده شد. این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود اما علت این تفاوت اتصال پلاکت‌های فعال شده به گلبول‌های سفید(مونوسیت و نوتروفیل‌ها) بوده است بدین ترتیب که این مجموعه در

Archive of SID
www.SID.ir

فیبرهای فیلتر محبوس شده و این اختلاف درصد را در روز صفر برای هر دو محصول ایجاد می‌کنند. همان‌طور که ذکر شد تماس فیبرهای فیلتری با پلاکت‌ها می‌توانند عاملی برای تحریک آن‌ها باشند که این تحریک می‌تواند سبب فعال شدن آن‌ها گردد.

در مطالعه حاضر مجموع برآیند تاثیر فیلتراسیون پیش از ذخیره(کاهش لکوسیتی و سیتوکین‌ها و مواد بیولوژیک فعال) و تاثیر فیزیکی آن(دست‌کاری‌های فیزیکی) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده آن بود که مجموع برآیند مثبت به سمت تاثیر فیلتراسیون پیش از ذخیره می‌باشد. در واقع در این مطالعه تغییر محسوسی که ناشی از تماس فیزیکی فیبرهای فیلتر با پلاکت باشد تا بتواند اثرات مثبت حذف لکوسیتی را تحت تاثیر قرار دهد، مشاهده نشد(مشاهدات غیرمستقیم).

این مطالعه در سازمان انتقال خون می‌تواند قدم جدیدی برای تدوین برنامه کنترل کیفی فراورده‌های خونی و ابزارهای به کار گرفته شده در تهیه آن‌ها و نیز تولید خون سالم باشد بنابراین با به کار گیری فیلترهای IN-LINE در تهیه محصولات لکوسیت کاهش یافته، به خصوص محصول پلاکت، می‌توان بازده درمانی آن را به طور چشم‌گیری افزایش داد و شاید بتوان با این عمل روند فعال شدن پلاکتی را در طی مدت نگه‌داری کاهش داد.

هزینه اقتصادی استفاده از این گونه فیلترها و هزینه درمانی آن به مراتب کم‌تر از هزینه فیلترهای Bedside و استفاده چندین واحد پلاکتی می‌باشد زیرا با استفاده از فیلترهای IN-LINE می‌توان چندین محصول پلاکتی را با یکدیگر مخلوط کرده و به ۱ واحد پلاکتی منفرد(مجموع ۱۰ واحد) تبدیل کرد. هم‌چنین استفاده از این گونه فیلترها، هزینه و مشکلات آموزشی برای کادر درمانی بیمارستان‌ها را به دنبال نخواهد داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سازمان انتقال خون ایران و دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در حمایت از پروژه و آقایان کامران عطاردی، دکتر شهرام وائلی و خانم‌ها اعظم‌السادات طباطبائیان کاشانی و دکتر مقصودلو، کارکنان محترم سازمان انتقال خون ایران صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع

1- Philips TL, Rozya R, Louis D, Feridny F. Guidelines on the clinical use of leukocyte-depleted blood component. Transfusion Medicine 1998; 8: 59-71.

2- Norfk L, Mongeston L, Miliva F, Durka S. Benefits of leukodepletion of blood productes. Blood 1995; 86: 409-12.

3- Stenek I, Prins HK, Flory M. Mechanisms of leukocyte depleted of red cell concentrate by filtration. Transfusion 1991; 33: 42-50.

4- Htland G, Mollenk K, Berghe S, Soufa GH. Effect of filtration and storage of platelet concentrates on the production of the chemokine C5a, IL-8, TNF alpha, LB4. Transfusion 1998; 38: 16-23.

5- Mylle L, Peetem ME. Effect of prestorage Leukocyte removal on the cytokine levels stored platelet concentrates. Vox Sang 1994; 60: 14-8.

6- Mynester T, Dybakaya C, Reimert CM, Pedersen AN, Ostergard K, Vangsgaard K, et al. Prestorage leukofilteration of whole blood and SAGM blood prevents exteracellure bioactive accumulation. Inflammation Research 1999; 48: 363-8.

7- Wadhwan M, Seghacchin M, Lubenko A, Lozano T. Cytokine levels in platelet concentrates. British Journal Heamatology 1996; 93: 225-34.

8- Dzik W, Cuase F, Berghe S, Benix F. The effect of prestorage white cell reduction on the function and viability of platelet concentrates. Transfusion 1992; 32: 334-9.

9- Shba K, Tadakora M, Tielman B, Nakazoky FD. Activation of the contact system by filtration

Archive of SID
www.SID.ir

of platelet concentrates with negative charged filters. Transfusion 1997; 37: 452-62.

10- Sween JD, Stomberg R, Johansen B, Stephan M. Invitro and Invivo effect prestorage filtrated on aphersis platelet. Transfusion 1995; 35: 125-30.

11- Devin A, Bradley E, Mollenk K, Kastry A. Effect of prestorage white cell reduction on platelet aggregation formation and the activation statue platelet.Transfusion 1999; 39: 724-34.

12- Holem J, Cueeny S, Sawy M, Brenner T. The espression of P-selectin during collection processing and storage of platelet concentrates. Transfusion 1997; 37: 12-8.

13- Triuz TS, Kichler H, Tiloury M, Meroly B, Kevin M. Detection and significance alpha granule membrane protein 140 expression on platelet collected by aphersis. Transfusion 1992; 32: 529-33.

14- Herny M, Rinder A, Mourphy K, Helmer T, Monis G. Platelet activation and its detection during the preparation of platelet for transfusion. Transfusion medicine Reviews 1998; 2: 271-88.

15- FDA blood products advisory committee meeting. Slichter S.J. Extention of platelet storage 2002 March; 14-15: 1-13.

16- Rinder H, Murphy M, Stock K. Progressive platelet activation with storage. Transfusion 1991; 31: 409-14.

17- Snyder EL, Hezzy A, Stample L, Philips D, Sezary M. Occurrence of the release reaction during preparation and storage of platelet concentrates. Vox Sang 1988; 40: 115-9.

18- Fijnher R, Piterez R, Dekker W, Bradely W. Platelet activation during preparation of platelet concentrates. Transfusion 1990; 30: 219-30.

19- Hidehiko M, Johen Weinder, Charles C, Kelin B. Platelet membrane early activation

markers during prolonged storage. Thrombosis Research 1999; 93: 151-91.

20- Jerad S, Prane K. The platelet storage lesion. Transfusion Medicine Reviews 1997; 2: 130-44.

21- Gutensohen K, Bartsh P. Flow cytomery analysis of platelet antigen membrane. Platelet 1998; 18: 125-32.

22- Alan D, Michelson M, Zalin G, Alter F. Evaluation of platelet function by flow cytometry. Methods 2000; 2: 259-70.

23- Inger A, Hagberg T, Lyber F. Blood platelet activation evaluated by flow cytomery. Platelet 2000; 11: 137-50.

24- Chen W, Meara M, Rosylen H, Torina B. Flow cytomery analysis of platelet function in stored platelet concentrares. Transfusion Sciences 1999; 20: 129-39.

25- Fukunagan K, Shimoyaama T, Isaka FT, Nozina F. Invitro comparison study CD62P and CD63 expression after contacting leukocyte filters. Artificial Organs 1999; 23: 108-14.

26- Fristok K, Bodensein M, Doolittle G. Comparing study of leukocyte depleted filter for platelet concentrates. Transfusion 1990; 31: 19-27.

27- Devin DV, Bradly AJ, Maurer E, Levin E, Chahal K, Serrano K, et al. Effect of prestorage white cell reduction of platelet aggregation formation and the activation statue platelet. Transfusion 1999; 39: 724-34.

28- Sweeney JD, Holme S, Heaton AL, Nelson E. White cell-reduced platelet concentrates prepared by in-line filtration of platelet-rich plasma. Transfusion 1995; 35: 131-6.

29- Dzilk W, Gusach W, Heaton E, Merlin E. The effect of prestorage white cell reduction on the function and viability of stored platelet concentrates. Transfusion 1991; 32: 334-9.

Archive of SID

www.SID.ir

30- Ferre F, River J, Edvard J, Joner GH. Evaluation of leukocyte depleted platelet concetrates obtained by In-Line filtration. Vox Sang 2000; 78: 235-41.

Archive of SID

www.SID.ir

The Effect of Prestorage Filtration on Platelet Activation in Platelet Concentrates

***A. Solaimani Ferizhandy, MSc** [I] **M. Aghaee Pour, MD** [II]
A.A. Pourfatollah, Ph.D. [III]

Abstract

Preparation conditions and platelet storage for transfusion may cause platelet activation, which contributes to decreased ability of stored platelet to function and survive in vivo after transfusion compared with that seen with freshly prepared platelets. Using flowcytometry, we investigated platelet membrane expression of CD62P, CD63 in platelet stored for up to 3 days under standard blood banking conditions. Leukocyte reduction of platelet before transfusion is a routine procedure in many blood transfusion centers to prevent leukocyte side-effects. Twenty-four platelet units prepared by platelet-rich plasma were processed by in-line leukdepletion using an LRP10SE-Pall filter. The filtered and unfiltered platelet concentrates were compared during storage for CD62P, CD63 markers and pH. During storage for up to 3 days, leukdepleted platelet units displayed no significant pH difference in comparison with routine platelet preparation ($P>0.05$). During storage for up to 3 days (1, 3 days) leukdepleted platelet units displayed a decrease in the CD62P and CD63 expressions as compared with routine platelet preparation ($P<0.05$). There has been concern that filtration of platelet concentrates might activate platelets through direct contact with the filter. On the other hand, prestorage filtration removal of leukocyte might actually decrease platelet activation and preserve platelet function. This data has shown no platelet activation after filtration and measurement of CD62P and CD63 expressions; moreover, these markers can act as a useful in vitro mean to determine the quality of platelet components. In fact, the present research aimed at studying the effect of prestorage filtration on platelet activation in platelet concentrates.

Key Words: 1) Prestorage Filtration 2) Platelet-Rich Plasma 3) CD62P 4) CD63

Archive of SID

The present article is the summary of the thesis by A. Solaimani Ferizhandi for MSc degree in Hematology under supervision of M. Aghaee Pour, MD & consultation with A.A. Pourfatollah, Ph.D.(2003) This study was also conducted under financial support of Iran Blood Transfusion Organization.

I) *MSc in Hematology. Iran Blood Transfusion Organization, Hemmat Exp.way.(*Corresponding Author)*
II) *Assistant Professor of Pathology. Iran Blood Transfusion Organization.*
III) *Associate Professor of Immunology. Tarbiat Modarress University, Tehran, Iran.*

www.SID.ir