خون
دوره ۴ شماره ۱ بهار ۸۶(۵۰-۴۱)

فعال شدن پلاکتی و تولید اینترلوکین – ۸ در فرآورده‌های متراکم پلاکتی تهیه شده به روش پلاسمای غنی از پلاکت و بافی کوت

پژمان بشکار[۱]، دکتر علی‌اکبر پورفتح اله[۲]، دکتر مژگان شایگان[۳]، محمدرضا آخوند[۴]

چکیده

سابقه و هدف

تهیه فرآورده‌های 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 فرآورده‌های پلاکتی طی روند تهیه، و مقایسه این دو روش تهیه یعنی پلاسمای غنی از پلاکت و بافی‌کوت مفید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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 کنژوگه 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 آلودگی 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 منوسیت‌ها از ۰/۴ تا ۰/۱ کاهش نامحسوسی نشان دادند.

نتیجه گیری

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

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

تاریخ دریافت : ۸۵/ ۴/۲۰
تاریخ پذیرش : ۸۵/۱۱/۲۸

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD ایمونولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- کارشناسی ارشد آمار حیاتی ـ دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

مقدمه

امروزه فرآورده‌های متراکم پلاکتی (PCs = Platelet Concentrates) به دو روش پلاسمای غنی از پلاکت (PRP= Platelet Rich Plasma) و بافی‌کوت(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(۵-۱). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در طی این روش میزان بالایی از لاکتات دهیدروژناز(LDH)، ترومبوگلوبولین بتا (β-TG) و CD62P از پلاکت‌ها ترشح می‌شود که نشان دهنده فعال شدن پلاکت‌ها می‌باشند(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 Plasma= PPP) 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(۱۲-۱).

گزارش‌های متعددی پیرامون افزایش غلظت سایتوکین‌ها، به ویژه، IL-8 ، IL-6، IL-1 و TNFα در طی نگهداری فرآورده‌های پلاکتی وجود دارد. منبع عمده سایتوکین‌ها در فرآورده‌های متراکم پلاکتی، گلبول‌های سفید و به ویژه منوسیت‌ها محسوب می‌شوند، تعداد بیش از ۳۰۰۰ گلبول سفید در میکرولیتر برای افزایش سایتوکین‌ها در فرآورده‌های پلاکتی نیاز است. لذا کاهش گلبول‌های سفید در این فرآورده‌ها باعث کاهش تولید سایتوکین‌ها می‌شود. در مطالعات اخیر نشان داده شده است که میزان آلودگی گلبول‌های سفید در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش بافی کوت بسیار کمتر از مقدار آن در فرآورده‌های تهیه شده به روش PRP می‌باشد، لذا سایتوکین‌های التهابی نیز در این فرآورده‌ها کمتر تجمع می‌یابند(۱۷-۱۳، ۵، ۳، ۱).

در این مطالعه CD62P سطحی و محلول در پلاکت‌های تهیه شده به دو روش مذکور مقایسه شدند و با اندازه‌گیری اینترلوکین- 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 اهداکنندگانی که جهت اهدای خون در پایگاه آموزشی، منطقه‌ای انتقال خون تهران پذیرش شدند، جمع‌آوری گردید. هر واحد به میزان نهایی ۴۵ ± ۴۵۰ میلی‌لیتر خون به همراه ضد انعقاد CPDA-1 و در مدت ۷ تا ۹ دقیقه جمع‌آوری شد. ضمناً یک لوله حاوی ماده ضد انعقاد 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 × 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 × ۴۰۰۰) و به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شد. حاصل این مرحله یک تکمه پلاکتی در ته کیسه و پلاسمای فاقد پلاکت یا 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

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

پلاکتی در آژیتاتور در دمای ۲۲°C به مدت ۳ روز نگهداری می‌شود(۱۴-۱۲، ۳، ۱).

تهیه فرآورده‌های پلاکتی به روش BC:

خون کامل درون کیسه‌های چهارتایی جمع‌آوری شده، سپس با دور سنگین(g × ۴۰۰۰) به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شدند. در این مرحله سه لایه درون کیسه تشکیل شد. سطحی‌ترین لایه پلاسمای فاقد پلاکت یا دارای پلاکت اندک بود که این لایه به یکی از کیسه‌های اقماری انتقال داده شد. لایه میانی که لایه بافی کوت می‌باشد، حاوی پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید بوده و این لایه نیز توسط دستگاه جداکننده به کیسه دیگر منتقل گردید. البته مقداری از گلبول‌های قرمز هم به همراه این لایه انتقال داده شد. سپس مقداری(۷۰cc- ۵۰cc) پلاسما از کیسه حاوی پلاسمای فاقد پلاکت به کیسه حاوی لایه بافی کوت برگردانده شد. نهایتاً کیسه‌های گلبول‌های قرمز فشرده و پلاسمای 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 می‌باشد به کیسه چهارم منتقل و باقی مانده آن که گلبول‌های سفید به همراه مقداری RBC می‌باشد جدا گردیده و دور ریخته شد(۱۶-۱۰، ۵، ۲). در این روش تکمه پلاکتی ایجاد نمی‌گردد و لذا پس از تهیه می‌توان آن را درون آژیتاتور ۲۲ درجه به مدت ۳ روز نگهداری نمود.

یکی از اهداف این تحقیق بررسی اثر مراحل تهیه فرآورده پلاکتی بر روی فعال شدن پلاکتی بوده است، لذا تعداد ۱۵ واحد خون کامل به عنوان فرآورده‌ای که هیچ گونه تغییری در پلاکت‌های آن اعمال نمی‌شود، جمع‌آوری گردیده و به مدت ۳ روز نگهداری شد.

نمونه‌گیری از کورد:

هنگام جداسازی کیسه‌ها، کیسه حاوی فرآورده پلاکتی را به همراه ۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متر کورد(Cord) جدا نموده، سپس جهت نمونه‌گیری از کیسه‌ها، در شرایط استریل و در کنار شعله پس از برگرداندن محتوای درون کورد توسط 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 ۲-۱ سی‌سی فرآورده را دور ریخته تا pH مسیر درون کورد با pH فرآورده پلاکتی یکسان شود. سپس مقدار ۵ تا ۷ سی‌سی فرآورده را درون لوله آزمایش ریخته و پس از آن کورد را از ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر مانده به انتهای آن ابتدا با بست آلومینیوم مسدود نموده و سپس در همین شرایط کورد را توسط سیلر مسدود می‌کنیم. در این روش هیچ گونه آلودگی و یا اکسیژن به داخل کیسه وارد نخواهد شد و لذا محیط کیسه هم چنان بسته خواهد ماند.

نمونه‌گیری از فرآورده‌های 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 می‌باشد انجام شد. از نمونه‌های کنترل فقط در روزهای صفر و ۳ نمونه‌گیری شد.

کنترل کیفی واحدهای PC

با استفاده از دستگاه pH متر(Metrohm)، pH تمام نمونه‌ها در روزهای صفر، یک و سه اندازه‌گیری شد. شمارش پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید و قرمز به روش دستی و توسط لام نئوبار انجام گرفت.

لوله‌های حاوی خون EDTA دار جهت شمارش کامل سلول‌های خونی توسط دستگاه سیس‌مکس و مقایسه تعداد پلاکت‌ها و تخمین میزان پلاکت‌های درون فرآورده متراکم پلاکتی مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور بررسی آلودگی باکتریایی فرآورده‌های متراکم پلاکتی، از تعدادی از واحدها به صورت راندوم در روز ۳ در شرایط استریل، کنار شعله کشت گرفته شد. جهت کشت از محیط‌های بلادآگار و ائوزین 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 کیت‌ها به دمای اتاق رسانده شد. روش آزمایش طبق پروتکل شرکت سازنده کیت(داکو)

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

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(فایکواریترین)، به آن افزوده شد. سپس به مدت نیم ساعت در دمای ۴°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(۲۰-۱۸، ۱۶، ۱۲).

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 کنژوگه 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 آنتی‌ژن سطح منوسیت‌ها می‌باشد و منوسیت‌ها 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 پلاسما:

برای سنجش کمی IL-8 از کیت اینترلوکین ۸ انسانی(رُوش) و روش الیزا استفاده شد که کمترین مقدار قابل ردیابی آن ۶/۲ pg/ml بود. اینترلوکین ۸ انسانی یک روش Enzyme - Linked Immunosorbant است که برای 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 نمونه‌های گرفته شده از فرآورده‌ها، از کیت الیزا(آمریکا ـ P-selectin) استفاده شد. اندازه‌گیری CD62P به روش ایمونواسی، یک الیزای فاز جامد با مدت زمان ۲۵: ۱ ساعت می‌باشد. اساس این آزمایش، روش ایمونواسی 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 کنژوگه با پراکسیداز به میکروپلیت اضافه می‌شود. پس از برداشتن آنتی‌بادی‌های کنژوگه باند نشده طی سه مرحله شستشو، سوبسترای مناسب اضافه شده که رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت CD62P در نمونه می‌باشد(۲۰-۱۸، ۱۶، 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 واحدها، تفاوت قابل ملاحظه‌ای ندارند و تنها در PRP-PC کمی بیشتر از BC-PC است. استاندارد شمارش پلاکتی در یک واحد، $۱۰^{۱۰} \times ۱۸-۴$ 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

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

جدول شماره ۱: میانگین(SD ±) شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید و میزان pH در فرآورده‌های پلاکتی

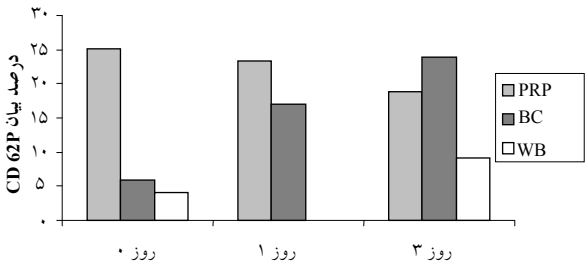
	PRP	BC	WB
PLT $\times 10^{10}$/Unit	۷/۲ ± ۲/۱	۶/۵ ± ۱/۸	۷/۲۹ ± ۱/۷
WBC $\times 10^{9}$/Unit	۰/۵۲ ± ۰/۳۳	۰/۱۱ ± ۰/۲۳	۲/۶ ± ۰/۵۸
pH روز سه	۷/۱۳ ± ۰/۱۳	۷/۰۶ ± ۰/۱۹	۷/۱۷ ± ۰/۱۴

خون کامل، در یک واحد پلاکتی جمع‌آوری شده‌اند. طبق استانداردهای اروپایی شمارش قابل قبول گلبول‌های سفید در واحدهای پلاکتی باید در محدوده ۱×۱۰^{۹}-۰/۴ و میزان pH بین ۶/۴ تا ۷/۴ باشد(۳-۱).

جهت شمارش افتراقی از رسوب فرآورده‌ها گسترش تهیه شد و پس از فیکس شدن، توسط گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. نتایج نشان دادند که ۸۰ درصد گلبول‌های سفید را لنفوسیت و مابقی را نوتروفیل‌ها تشکیل می‌دهند. درصد بسیار کمی نیز منوسیت‌ها می‌باشند. این یافته نیز با میزان سلول‌های CD14 مثبت که توسط فلوسیتومتری ارزیابی شد، تطابق داشت.

pH تمامی واحدهای پلاکتی مورد مطالعه و نمونه‌های کنترل از نظر کیفیت پلاکت تولید شده وضعیت مطلوبی داشتند و pH آن‌ها در محدوده ۰/۳ ± ۷/۲ بود.

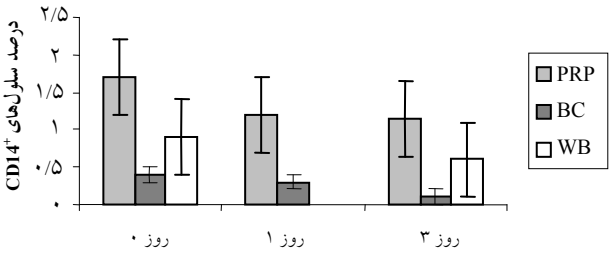
بیان سطحی CD62P در پلاکت‌های حاصل از روش PRP در روزهای صفر، یک و سه به ترتیب ۲۵/۲، ۲۳/۴ و ۱۸/۸ درصد می‌باشد که این اختلاف معنی‌دار است(p=۰/۰۴). اما این مقدار در پلاکت‌های تهیه شده به روش BC در روز صفر ۵/۸ درصد و در روز یک ۱۷/۱ و در روز سه، ۲۳/۳ درصد می‌باشد که این اختلاف با p=۰/۰۰۱ معنی‌دار می‌باشد. میزان پلاکت‌های فعال شده در نمونه‌های کنترل در روز صفر ۴/۱ درصد و در روز سه ۹/۲ درصد است. هم چنین بین دو گروه(PRP-PC و BC-PC) در روز صفر اختلاف وجود دارد(p=۰/۰۰۱). اما در روز سه ذخیره سازی، تفاوتی در میزان پلاکت‌های فعال شده در دو گروه وجود ندارد. در مقایسه گروه BC-PC با گروه کنترل در روز صفر، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، در صورتی که این اختلاف در مقایسه گروه PRP-PC با گروه کنترل مشهود است(p=۰/۰۰۱). 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 منوسیت می‌باشند. این میزان در روز سه به ۱/۲ درصد رسیده است و این اختلاف با p=۰/۰۶ معنی‌دار می‌باشد. در BC-PC، میزان این سلول‌ها در روز صفر ۰/۴ درصد و در روز سه ۰/۱۱ درصد بودند(p=۰/۰۰۱). این میزان در خون کامل در روز صفر ۰/۹ درصد و در روز سه، ۰/۶ درصد بود. ارتباط قابل ملاحظه‌ای بین نتایج حاصل از فلوسایتومتری با نتایج حاصل از شمارش افتراقی در تعداد منوسیت‌ها وجود دارد و می‌توان نتیجه گرفت که میزان منوسیت‌ها در BC-PC بسیار کمتر از مقدار آن در PRP-PC است، هم چنین در روز صفر، اختلاف آماری بین دو گروه PRP-PC و BC-PC وجود دارد(p=۰/۰۰۱). در شکل شماره ۲ سلول‌های CD_{14} مثبت در سطح پلاکت‌ها در هر سه گروه نشان داده شده‌اند.

غلظت CD62P محلول در روز صفر در هر سه گروه تفاوت معنی‌داری ندارد. نتایج مربوط به مقدار CD62P



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

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

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

گروه / sCD62P	PRP	BC	WB	P value BC , PRP	P value WB, PRP	P value WB , BC
روز صفر(mean ± SD)	۸۶/۸ ± ۲۱/۵	۸۸/۳ ± ۴۴/۲	۶۴/۷ ± ۲۵	۰/۷	۰/۰۶	۰/۱
روز یک(mean ± SD)	۹۹/۵ ± ۳۵/۵	۲۲۶/۸ ± ۱۱۶/۱	*	۰/۰۰۱	*	*
روز سه(mean ± SD)	۱۱۱/۴ ± ۴۲/۶	۳۰۱/۳ ± ۱۰۰/۹	۹۲/۱ ± ۲۸/۹	۰/۰۰۰۱	۰/۲	۰/۰۰۰۱
P value مقایسه روز صفر و سه	۰/۰۰۹	۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	*	*	*
P value مقایسه روز یک و سه	۰/۰۹	۰/۰۴	*	*	*	*

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

گروه / IL-8	PRP	BC	WB	P value BC , PRP	P value WB, PRP	P value WB , BC
روز صفر(mean ± SD)	۲۳/۴ ± ۸/۷	۱۳/۸ ± ۶/۱	۸/۵ ± ۷/۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱
روز یک(mean ± SD)	۴۷/۱ ± ۴۱/۷	۲۴/۳ ± ۱۰/۹	*	۰/۰۶	*	*
روز سه(mean ± SD)	۱۲۶/۶ ± ۲۳۷/۶	۳۸/۸ ± ۱۹/۶	۱۴/۲ ± ۵/۵	۰/۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
P value مقایسه روز صفر و سه	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲	*	*	*
P value مقایسه روز یک و سه	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	*	*	*	*

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=۰/۲)، اما تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین گروه BC-PC و گروه کنترل وجود دارد(p=۰/۰۰۰۱).

غلظت IL-8 در روز صفر در PRP-PCs در مقایسه با روش BC به صورت معنی‌داری کمتر می‌باشد(p=۰/۰۰۳). 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 معنی‌داری 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 فعال شده بیشتری قرار دارند و به نظر می‌رسد حدود یک چهارم پلاکت‌های موجود در PRP-PCs در روز صفر فعال شده و احتمالاً در عمل در بدن فاقد کارآیی لازم می‌باشد (p< ۰/۰۵). هم چنین در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP تعداد گلبول‌های سفید بسیار بیشتر بودند، لذا اینترلوکین – ۸ که منبع عمده ترشح آن گلبول‌های سفید و به خصوص منوسیت‌ها می‌باشند، در این فرآورده‌ها در سطح بالاتری قرار داشت(p< ۰/۰۵). 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 بافی‌کوت از روز صفر به بعد رو به افزایش بوده است.

بسیاری از محققین روش‌های تهیه پلاکتی BC و PRP 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).

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

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 هیچ‌گونه 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 محتویات گرانولی آن‌ها مثل CD62P و β 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 بافی‌کوت 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 ۱۲/۹ درصد می‌رسد که این کاهش به دلیل برگشتن 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 $۰/۸ \pm ۰/۲\times۱۰^{۱۱}$ و $۱/۰۴\times۱۰^{۷} \pm ۱/۱$ گزارش شد. هم چنین غلظت CD62P محلول در فرآورده‌های تهیه شده به روش بافی کوت در روزهای صفر، یک و سه به ترتیب ۱۴/۷ ± ۴۸/۱ و ۲۲/۹ ± ۶۴/۲ و ۴۱/۸ ± ۱۱۱ بود(۲۵).

دایورز و همکاران در سال ۱۹۹۴ میزان CD62P محلول در مایع رویی نمونه‌های تهیه شده از کنسانتره‌های 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 فرآورده‌ها کمتر باشد میزان تجمع سیتوکین‌ها نیز کمتر خواهد بود(۲۷).

ارتباط بین شمارش بالای گلبول‌های سفید و تجمع سیتوکین‌ها، در سال ۱۹۹۵ توسط فلزل در آلمان مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده نمود که شمارش گلبول‌های سفید در BC-PCs کمتر از ۳×۱۰^{۹} و تجمع IL-8 بسیار اندک می‌باشد(۲۹، ۲۸).

استاک و همکارانش در سال ۱۹۹۳ طی یک تحقیق، غلظت سیتوکین‌ها را مورد ارزیابی قرار داده و گزارش نمودند که در PRP-PC غلظت اینترلوکین – 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 اینترلوکین- ۸ در فرآورده‌های پلاکتی وجود دارد که این یافته‌ها با یافته‌های ما نیز تطابق دارد($r=۰/۲$ ، $p<۰/۰۵$)(۳۰).

نتیجه‌گیری

در پایان این تحقیق نشان می‌دهد که روند فعال شدن پلاکت در فرآورده‌های تهیه شده به روش پلاسمای غنی از پلاکت بیشتر از فرآورده‌های تهیه شده به روش بافی کوت صورت می‌گیرد. هم چنین تعداد گلبول‌های سفید موجود در PRP-PC بیشتر از BC-PC بوده و سطح اینترلوکین – ۸ در PRP-PC بسیار بیشتر از BC-PC می‌باشد. لذا نتیجه می‌گیریم که فرآورده‌های 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

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

در استفاده این فرآورده کمتر اتفاق خواهد افتاد.

تشکر و قدردانی

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

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 componet preparation. Transfusion Med Rev 1997; 11: 116-29.
5- Blumberg N, Hicks GL, Kisher Wh. Association of ABO mismatched platelet transfusions with morbidity and mortility in cardiac surgery. Transfusion 2001: 790.
6- Anderson KC, Ness PM. Scientific basis of transfusion medicin, implication for clinical practice. Philadelphia: Saunders; 2000.
7- Heal JM, Rowe JM, McMican A. The role of ABO mathching 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 22C and citrate anticoagulation on the cytokine of mononuclear leukocyte . Vox Sang 1998; 75: 12-7.
11- Christapher D, Hillger , Lesilie 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 apoptotics 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, Chulivi A, Hashemi S. Effect of platelet concentrates on the accummlation of cytokins and platelet release factors during storage. Transfusion 1999: 150-5.
17- Wadhava M, Krailadsiri 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, Rudiyer 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 cytometery. Blood 1987; 70: 307-15
21- Lozane M, Estebanell E, Cid J, Diaz M, Mazzara R, Ordines A, *et al*. Platelet concentrates prepard 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

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

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 filteration. Transfusion 1995; 35: 917-20.
30- Snyder SG. Strorage of platelet concentrate. In: Harris JR, editor. Blood separation and plasma fractionation. New York: Wiley - Liss; 1990: 100-20.

Archive of SID

www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

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

Beshkar P.[1](MS), Pourfathollah A.A.[1](PhD), Shaiegan M.[2](PhD), Akhound M.R.[1](MS)

[1]Tarbiat Modarres University
[2]Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center

Archive of SID

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 monocolonal antibodies that conjugated with flourecence dye in flocytometric 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 Modarres University.
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821) 88013030.
E-mail: *Pourfa@modares.ac.ir*

www.SID.ir

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com