

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

علی رجیبی^۱، مینو احمدی نژاد^۲، مریم مشکولی^۳، سید محمدرضا طباطبایی^۴، سیده لادن سید مرتاض^۵، سمیه رن بلوچ^۳،
سیده سمیه معززی نکویی اصل^۶، زهره مختاری^۳، مهسا مجتنبوی نائینی^۷

چکیده

سابقه و هدف

اختلالات ارثی عملکرد پلاکتی در دنیا معمول می‌باشند 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، کلاژن، اسید آراشیدونیک و ریستوستین و ماده لومی‌نسانس برای بررسی تجمع و ترشح پلاکتی استفاده گردید. یافته‌های حاصل با استفاده از SPSS ۱۶ 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 ترومبوسیتوپنی با عملکرد طبیعی (۸/۲٪)، اختلال ترشحی (۶/۷٪)، ترومباستنی گلازمن (۴/۶٪)، سندروم برنارد سولیر (۲٪)، اختلال اکتسابی پلاکتی (۱/۵٪)، آفیبیرینوزمی (۰/۵٪) و اختلال عملکردی دسته بندی نشده (۲۲/۶٪) 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 متنوع‌تر و نیز بررسی ترشح پلاکتی در تمامی بیماران دارای اختلالات تجمع پلاکتی در مطالعه‌های آتی توصیه می‌شود.

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

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 آسیب شناسی بالینی و تشریحی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
- ۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۵- کارشناس علوم سلولی و مولکولی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۶- کارشناس ارشد انگل شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۷- کارشناس شیمی کاربردی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

اختلالات پلاکتی، از شایع‌ترین اختلالات خونریزی‌دهنده هستند. پلاکت‌ها تعدادی از گیرنده‌های غشایی گلیکوپروتئینی را بیان می‌کنند که چسبندگی (adhesion) و تجمع (aggregation) پلاکتی را میانجی‌گری می‌نمایند. بیشترین میزان گیرنده غشایی پلاکت‌ها، مربوط به اینترگرین $\alpha\text{IIb}\beta3$ است که بیشتر به نام گلیکوپروتئین IIb/IIIa شناخته می‌شود. این گیرنده در مرحله تجمع پلاکتی نقش اصلی را به عهده دارد. کمبود یا عملکرد ناقص $\alpha\text{IIb}\beta3$ 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 گلیکوپروتئین Ib/IX/V برای چسبندگی پلاکتی با واسطه عامل فون ویلبراند نقش حیاتی دارد. کمبود یا اختلال عملکرد گیرنده Ib/IX/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، به‌طور معمول از آگونیست‌های تجاری ADP، اپی‌نفرین، کلاژن و اسید آراشیدونیک و به‌علاوه آگونیست صنایع ریستوستین 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 تجارب کاری خود از آن‌ها استفاده می‌کند، اما هیچ‌الگوی استاندارد 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 (۳، ۲).

بررسی ترشح گرانول‌های پلاکتی، در ارزیابی اختلالات

عملکرد پلاکت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ترشح محتویات گرانول‌های متراکم پلاکت‌ها به وسیله رهاسازی سروتونین - کربن ۱۴ متعاقب تحریک توسط آگونیست‌های پلاکتی و یا به روش ساده‌تر توسط رهاسازی ATP از گرانول‌ها به وسیله یک روش کمی لومینسانس 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 به‌طور اساسی وابسته به ترشح گرانول‌های متراکم است، دیده نمی‌شود. بررسی اختلالات ترشحی بر خلاف آزمون تجمع پلاکتی، به دلیل هزینه بالا و وقت‌گیر بودن آن تنها در آزمایشگاه‌های مرجع انعقادی قابل انجام است (۶-۲).

به‌خاطر این‌که آزمون‌های تشخیصی اختلالات عملکرد پلاکتی گران و وقت‌گیر هستند و به‌طور گسترده در دسترس نیستند، تاکنون مطالعه‌ای مبتنی بر جمعیت برای تعیین شیوع اختلالات یادشده انجام نشده است. با این حال، اطلاعاتی در مورد شیوع نسبی اختلالات پلاکتی در مقایسه با دیگر مشکلات خونریزی‌دهنده (مثل بیماری فون ویلبراند) وجود دارد که بیانگر این هستند که اختلالات پلاکتی در جمعیت بسیار معمول می‌باشند و امکان دارد که شیوعی معادل و یا حتی بیشتر از بیماری فون ویلبراند 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). هم‌چنین 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

ADP با غلظت‌های بالا ($10 \mu\text{M}$ و $20 \mu\text{M}$) و کلاژن با غلظت بالا ($5 \mu\text{g/mL}$) 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 لوسیفیرین- لوسیفراز 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 لوسیفیرین و لوسیفراز) 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، فاقد 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 ($20 \mu\text{M}$ ، $10 \mu\text{M}$ و $5 \mu\text{M}$)، اسید آراشیدونیک ($0/5 \text{ mM}$)، کلاژن ($5 \mu\text{g/mL}$ و $2 \mu\text{g/mL}$) و ریتوستتین ($1/5 \text{ mg/mL}$)، میانگین پاسخ‌دهی به هر غلظت از آگونیست به صورت $\pm \text{SD}$ Mean 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 کنترل تایید شد. بر اساس فاصله اطمینان مقادیر طبیعی پاسخ‌دهی به آگونیست‌ها و لوسیفیرین- لوسیفراز، نتایج پاسخ‌دهی بیمارانی که خارج از محدوده

اختلالات ترشح پلاکتی شد. در این مطالعه از آگونیست‌های ADP، کلاژن، اسید آراشیدونیک و ریتوستتین برای ارزیابی تجمع پلاکتی و از ماده لومی‌نسانس محتوی لوسیفیرین- لوسیفراز 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 این اساس، نمونه‌گیری توسط لوله‌های خلاء (Vacutainer) مربوط به شرکت BD انگلستان حاوی ضد انعقاد سیترات سدیم $0/105$ مولار انجام شد.

پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) با استفاده از نمونه خون سیتراته و سانتریفیوژ با دور پایین (RCF بین $150-300$ بر اساس شمارش پلاکت اولیه فرد) و پلاسمای فاقد پلاکت (PPP) با استفاده از سانتریفیوژ با دور بالا (RCF بین $3000-2500$) به دست آمد. جمع‌آوری، 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 $5 \mu\text{M}$)، کلاژن ($2 \mu\text{g/mL}$)، آراشیدونیک اسید ($0/5 \text{ mM}$) و ریتوستتین ($1/5 \text{ mg/mL}$). 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 $12-482 \times 10^9/L$ و فاصله اطمینان $10^9/L \times 100 \pm 204$ (Mean \pm SD) بود. البته یک بیمار دارای ترمبوسیتوز شدید با شمارش پلاکتی $1900 \times 10^9/L$ از محاسبه فوق حذف گردید. از میان ۱۹۵ مراجعه کننده، ۶۷ بیمار (۳۴/۴٪) دارای ترمبوسیتوپنی (پلاکت اولیه کم تر از $150 \times 10^9/L$) بودند.

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

به طور کلی از میان ۱۹۵ مراجعه کننده، ۱۰۵ مورد (۵۳/۸٪) از نظر شمارش و عملکرد پلاکتی کاملاً طبیعی و ۹۰ مورد (۴۶/۱٪) دارای اختلال کمی و/یا کیفی پلاکتی بودند. بیماران دارای اختلال کمی و کیفی پلاکتی شامل موارد زیر بودند: ۴۴ بیمار (۲۲/۶٪) اختلالات عملکردی پلاکتی دسته بندی نشده، ۱۶ بیمار (۸/۲٪) ترمبوسیتوپنی با عملکرد طبیعی پلاکتی، ۱۳ بیمار (۶/۷٪) اختلال ترشح ATP (رها سازی گرانولی)، ۹ بیمار (۴/۶٪) ترومباستنی گلانزمن، ۴ بیمار (۲/۲٪) برنارد سولیر، ۳ بیمار (۱/۵٪) اختلالات پلاکتی به دلیل مصرف دارو (اختلال پلاکتی اکتسابی) و یک بیمار (۰/۵٪) اختلال پلاکتی به دلیل آفیبیروژنمی (نمودار ۱). ۶ مورد از ۹ بیمار دارای الگوی ترومباستنی گلانزمن، و ۳ مورد از ۴ بیمار دارای الگوی برنارد سولیر در آزمون تجمع پلاکتی، توسط بررسی فلوسیتومتری تایید شدند.

بیماران دارای پاسخ برگشت پذیری به آگونیست ها به ویژه نسبت به ADP، مورد ارزیابی آزاد سازی 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 کلاژن، ۴ بیمار به ADP و کلاژن، 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 غریبه بودند، اما در مورد بیماران برنارد سولیر، دو مورد از بیماران دارای والدین با نسبت فامیلی نزدیک، یک مورد فامیل دور و یک مورد هم غریبه بودند.

طبیعی هر آگونیست قرار می گرفت، به عنوان "غیر طبیعی" در نظر گرفته می شد. نتایج مطالعه با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مربوط به شرکت Polar Engineering تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

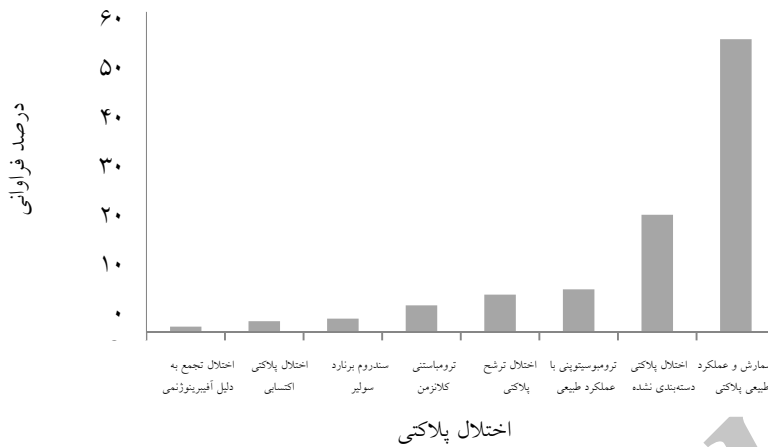
این پژوهش بر پایه یک مطالعه گذشته نگر بر روی ۱۹۵ فرد دارای مشکلات خونریزی دهنده طراحی شده که به منظور بررسی عملکرد پلاکتی به آزمایشگاه مرجع انعقاد ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ایران مراجعه کرده بودند. سن بیماران مراجعه کننده از یک ماه تا ۸۱ سال و با میانگین ۲۸ سال بود. ۶۱/۵٪ بیماران، بالغین بین سنین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

علت مراجعه ۴۶٪ بیماران مراجعه کننده (۸۹ نفر)، مشکلات خونریزی جلدی - مخاطی مانند خونریزی بینی و لثه، اکیموز و خونریزی های قاعدگی (منوراژی) بود. دیگر بیماران با عللی مانند بررسی علت ترمبوسیتوپنی (۳۹ مورد)، ترمبوسیتوز شدید (یک مورد)، خونریزی دستگاه گوارش (یک مورد) و دیگر علل متفرقه (۶۵ مورد) مانند بررسی چک آپ روتین، چک آپ قبل یا بعد از جراحی و سابقه خانوادگی مشکلات خونریزی دهنده یا کمبود فاکتورهای انعقادی به این مرکز ارجاع داده شده بودند. ۱۲۹ نفر (۶۶/۱۵٪) از مراجعین را زنان و ۶۶ نفر (۳۳/۸۵٪) را مردان تشکیل می دادند.

بر اساس شرح حال بیماران، درجه خونریزی (bleeding score) بر اساس معیار تورتو و همکاران، در ۶۲٪ بیماران کمتر از ۲، ۲۸/۴٪ بین ۳-۵ و در ۹/۶٪ موارد بیشتر یا مساوی ۶ بود (۱۲). از میان ۱۹۵ مراجعه کننده، ۴ بیمار داروهای ضد پلاکت مانند آسپیرین و پلاویکس و ۹ بیمار داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی مصرف می کردند. 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).

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

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

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

فاصله اطمینان پاسخ طبیعی ترشح (nMole)	آگونیست القا کننده ترشح ATP
۰/۵-۱/۰۶	۱۰ μM ADP
۰/۷۴-۱/۹۲	کلاژن ۵ μg/mL
۰/۵۶-۱/۴	اسید آراشیدونیک ۰/۵ mM

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 برسد (۸، ۱۳-۱۵)، مثلاً در یهودیان عراقی و یا اعراب فلسطین و اردن که می‌تواند تا ۶ مورد در هر ۷۰۰ نفر جمعیت هم رخ 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).

اگر چه 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،

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 ± SD محاسبه گردید. افرادی که میزان پاسخ‌دهی خارج از این فاصله داشتند به

مورد کلاژن، از دوز $2 \mu\text{g/mL}$ برای تمامی بیماران استفاده شد و بیمارانی که با این دوز پاسخ ضعیف یا عدم پاسخ را نشان می‌دادند، با دوز $5 \mu\text{g/mL}$ نیز بررسی شدند. با این حال معیار تشخیص موارد طبیعی یا غیر طبیعی، میزان پاسخ‌دهی به دوز $2 \mu\text{g/mL}$ کلاژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل بود. آگونیست‌های اسید آراشیدونیک (0.5 mM) و ریتوستین ($1/5 \text{ mg/mL}$) 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 (۸). تعداد و شکل طبیعی پلاکت‌ها، پاسخ طبیعی به ریتوستین به همراه طولانی بودن زمان خون‌روی (BT) در همه بیماران و کاهش پاسخ به کلاژن، ADP و ترومبین را در اغلب بیماران مورد تاکید 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 مذکر در این مطالعه ۱۶٪، بیش از بیماران مونث بود و والدین ۹۰٪ بیماران نیز خویشاوند بودند. خونریزی‌های مخاطی و اکیموز، علامت بالینی عمده 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/V بررسی شدند (۱۰). 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 (۸-۱۱). 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 فلوسیتومتری در دستور کار قرار داد.

اختلالات اکتسابی پلاکت‌ها، درصد قابل توجهی از ناهنجاری‌های عملکردی پلاکت‌ها را تشکیل می‌دهند (۲). علی‌رغم این موضوع، به نظر می‌رسد که اختلالات اکتسابی، سهم قابل توجهی را از عملکرد معیوب 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 ایبوپروفن 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 غلظتی 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 $5 \mu\text{Mol/L}$ شروع شده و بیمارانی که به این غلظت پاسخ نمی‌دادند، با غلظت‌های $10 \mu\text{Mol/L}$ و $20 \mu\text{Mol/L}$ نیز بررسی گردیدند. معیار طبیعی یا غیر طبیعی بودن پاسخ بیماران به ADP، بر اساس میزان پاسخ‌دهی به دوز ADP $5 \mu\text{Mol/L}$ در مقایسه با نمونه‌های کنترل افراد سالم بود. در

می‌توان در پژوهش‌های آتی با ترکیب آگونیست‌های متعدد دیگر به همراه بررسی‌های مولکولی و فراساختاری پلاکت‌ها، به اختلال دقیق‌تر بیماران مانند نقص در مسیر ساخت ترومبوکسان، اختلال در مسیر پیام‌رسانی پلاکت‌ها و یا نقص در پروتئین‌های ساختاری پلاکت پی برد.

اختلال پلاکتی به دلیل آفیرینوژنمی نیز در یک بیمار یافت شد. بیماران فاقد فیبرینوژن قادر به تجمع پلاکت‌ها نمی‌باشند. این موضوع بیانگر اهمیت فیبرینوژن در ایجاد تجمع پلاکتی در درون بدن می‌باشد. به نظر می‌رسد که اختلال تجمع پلاکتی به دلیل کمبود و یا نبود فیبرینوژن پدیده‌ی 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 پلاکت‌ها در آزمون تجمع پلاکتی طبیعی بود که نشان‌دهنده عملکرد طبیعی پلاکت‌ها در این بیماران می‌باشد.

در شمار قابل توجهی از مراجعه‌کنندگان یعنی ۱۰۵ مورد (۵۳/۸۵٪)، پلاکت‌ها هم از نظر کمی (شمارش) و هم کیفی (تجمع) طبیعی بودند. درجه خونریزی بر اساس معیارهای توزتو، 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 مراجعه‌کننده به این مرکز، مشکل خونریزی‌دهنده 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.

نتیجه‌گیری

به دلیل این که تاکنون هیچ توافقی بر روی روش انجام، استانداردسازی و گزارش آزمون‌های عملکرد پلاکتی در دنیا وجود ندارد، تفسیر و مقایسه این آزمون‌ها بین آزمایشگاه‌های مختلف ناممکن خواهد بود. هر چند ایجاد یک روش بین‌المللی 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 مطالعه‌های تجمع و ترشح پلاکتی ایجاد گردد.

مشخص شد که جهش بد معنی Ser (missense) > ۵۵ GP IX Phe در دو خانواده و یک جاگذاری (insertion) تک بازی GP 1BA C3221 ins در ژن GP Iba در خانواده سوم وجود دارد. در میان اعضای خانواده‌های مورد بررسی نیز چندین مورد هتروزیگوت مشاهده کردند.

فارسی‌نژاد 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 علائم خونریزی دسته‌بندی کرده و دریافتند که گلانزمن تیپ I (نبود GP IIb/IIIa) شایع‌ترین نوع در ایران است، به طوری که ۷۵٪ بیماران را تشکیل می‌دهد (۱۱). ۱۶٪ بیماران در تیپ II (دارای کاهش GP IIb/IIIa) و ۶٪ در گروه واریان گلانزمن (ناخوانی GP IIb/IIIa در اتصال به فیبرینوژن) جای گرفتند.

نویشتار حاضر نخستین گزارش بررسی اولیه و هم‌زمان تجمع و ترشح پلاکتی در بیماران مراجعه‌کننده مبتلا به اختلالات خونریزی‌دهنده در ایران می‌باشد.

به طور کلی در دنیا شیوع اختلالات عملکردی پلاکتی و از جمله اختلالات ترشحی به وضوح مشخص نشده است، اگر چه به نظر می‌رسد که اختلالات مربوط به ترشح و نیز انتقال پیام پلاکتی شایع‌تر از دیگر اختلالات باشد (۲۲-۲۴). به دلیل محدودیت تهیه مواد لومی‌سناس، امکان بررسی همه بیماران مشکوک به اختلال ترشح پلاکتی مقدور نبود و تنها ۱۳ بیمار (۶/۷٪) که واکنش برگشت‌پذیر به آگونیست‌ها نشان دادند، مورد بررسی رهاسازی ATP قرار گرفتند که همه این افراد اختلال ترشح را نشان دادند. بنابراین جامعه هدف مورد مطالعه در این زمینه کافی نبوده و برای ارزیابی دقیق میزان شیوع اختلالات ترشحی، نیاز به بررسی گروه هدف وسیع‌تری وجود دارد.

اختلال دسته‌بندی نشده عملکردی پلاکت‌ها در ۴۴ بیمار (۲۲/۶٪) از مجموع ۹۰ بیمار مبتلا به اختلال عملکرد پلاکتی دیده شد. این بیماران شامل بیمارانی می‌شدند 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 توزتو کمتر از ۳ بود.

طور دقیق تری 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

نویسندگان 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 اتلاف وقت و هزینه آزمایشگاه و نیز تخمین بالاتر بیماران خونریزی 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:

- Hayward CP. Diagnostic approach to platelet function disorders. *Transfus Apheresis Sci* 2008; 38(1): 65-76.
- 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.
- Hayward CP, Eikelboom J. Platelet function testing: quality assurance. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(3): 273-82.
- Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC. Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest* 1977; 60(4): 866-73.
- 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.
- 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.
- Hayward CP. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev* 2011; 25(4): 169-73.
- Razjou F. Glanzmann's thrombasthenia in Iran. *Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 2001; 5(2): 52-8. [Article in Farsi]
- Shams Asanjan K. A survey on platelet surface glycolproteins in patients with Bernard-Soulier syndrome by flowcytometry . *Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 2005; 8(4): 21-6. [Article in Farsi]
- 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.
- Farsinejad A, Abolghasemi H, Kazemi A, Aghaiipour M, Hadjati E, Farnoush M, *et al*. Classification of Iranian patients with Glanzmann's Thrombasthenia using a flow cytometric method. *Platelets* 2011; 22(5): 321-7.
- Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. *Blood Rev* 2007; 21(2): 89-97.
- D'Andrea G, Chetta M, Margaglione M. Inherited platelet disorders: thrombocytopenias and thrombocytopathies. *Blood transfuse* 2009; 7(4): 278-92.
- 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.
- Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 10.
- Seligsohn U, Rososhansky S. A Glanzmann's thrombasthenia cluster among Iraqi Jews in Israel. *Thromb Haemost* 1984; 52(3): 230-1.
- Awidi AS. Increased incidence of Glanzmann's thrombasthenia in Jordan as compared with Scandinavia. *Scand J Haematol* 1983; 30(3): 218-22.
- Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 46.
- Hayward CP. Inherited platelet disorders. *Curr Opin Hematol* 2003; 10(5): 362-8.
- Harrison P. Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol* 2000; 111(3): 733-44.
- 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.
- Rao Ak. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *J Thromb Haemost* 2003; 1(4): 671-81.
- Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1628-36.
- Santos XM, Bercaw-Pratt JL, Yee DL, Dietrich JE. Recurrent menorrhagia in an adolescent with a platelet secretion defect. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2001; 24(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.¹, Ahmadinejad M.¹, Mashkooli M.¹, Tabatabaei S.M.R.¹, Seyed Mortaz S.L.¹,
Ran-Balooch S.¹, Moazezi Nekoui-Asl S.S.¹, Mokhtari Z.¹, Mojtabavi Naeini M.¹

¹Blood 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 thrombasthenia (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