Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.44; No 4

Evaluation of oxidative stress in platelet during storage of platelet concentrate

Malihe Mohammadi Dahj[1], Fatemeh Amiri[2], Mohammad Reza Deyhim[1*], Mahin Nikoogftar Zarif[1]

1. Blood Transfusion Research Center High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

2. School of Paramedicine, Hamedan University of Medical Sciences

(Received: 2019/08/27 Accept:2020/01/8)

Abstract

Background: *Platelets undergo a series of biochemical, functional, and morphological changes during storage that are collectively called platelet storage damage, which can reduce platelet function and survival. Oxidative damage is one of the leading causes of platelet storage damage. Therefore, in the present study, an attempt has been made to determine the effect of oxidative stress on platelets during storage. This research was conducted in 2017 at the Research Center of the Iranian Blood Transfusion Organization.*

Materials and Methods: *In the current experimental study, 10 platelet concentrate bags prepared by platelet-rich plasma (PRP) were examined. Research parameters include measurement of mitochondrail reactive oxygen species (ROS), concentration of malondialdehyde (MDA), concentration of nitric oxide metabolites (nitrate / nitrite), activity of lactate dehydrogenase enzyme (LDH) and platelet count on days 1 ,3 ,5 and 7 of platelet storage. Statistical analysis of variance was used to describe the obtained data*

Results: *According to the results, ROS (16.22±37), MDA (11.6±22.2) concentration and LDH enzyme activity (310±3680) increased significantly ($P<0.001$) while PLT count was significantly decreased ($P<0.001$).*

Conclusion: *It seems that oxidative damage occurred in platelet with increasing radical oxygen species and lipid peroxidation which can reduce platelet count and platelet viability during platelet storage. Using anti-oxidant as an additive in platelet concentrate may decrease oxidative damage and increase platelet viability and quality during storage.*

Keywords: *Platelet storage lesion; Oxidative stress; Platelet concentrate; Platelet storage*

** Corresponding: Mohammad Reza Deyhim*

Email:mrdeyhim@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ٤٤، شماره ٤، ١٣٩٩، صفحات ٥٨٧ تا ٥٩٣

بررسی استرس اکسیداتیو در پلاکت‌های کنسانتره در طول مدت نگه‌داری

ملیحه محمدی دهج [۱]، فاطمه امیری [۲]، محمد رضا دیهیم* [۱]، مهین نیکوگفتارظریف [۱]

۱- مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون
۲- دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پیراپزشکی گروه علوم آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۸/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۸/۱۰/۱۸

چکیده:

سابقه و هدف: پلاکت‌ها در مدت ذخیره‌سازی دچار یکسری تغییرهای بیوشیمیایی، عملکردی و مرفولوژیک می‌شوند که به مجموع آن‌ها آسیب ذخیره پلاکت گفته می‌شود که می‌تواند سبب کاهش عملکرد و کاهش بقای پلاکت‌ها شود. آسیب اکسیداتیو یکی از دلایل اصلی آسیب ذخیره پلاکت است. به همین دلیل در این مطالعه سعی شده به تعیین تاثیر استرس اکسیداتیو در پلاکت‌ها در طول مدت نگه‌داری پرداخته شود. این تحقیق در سال ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام شده است.

مواد و روش‌ها: دراین مطالعه که از نوع تجربی بود، ۱۰کیسه کنسانتره پلاکت تهیه شده به روش پلاکت غنی از پلاسما (*PRP*)، بررسی شد. پارامترهای تحقیق شامل، اندازه گیری گونه‌های فعال اکسیژن میتوکندریایی(*ROS*)، غلظت مالون دآلدئید(*MDA*)، غلظت متابولیت‌های نیتریک اکسید (نیترات /نیتریت) ، فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز(*LDH*) و شمارش پلاکت‌ها در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ نگه‌داری بود. در این مطالعه برای توصیف داده‌های به‌دست آمده از آنالیز آماری واریانس استفاده شد.

یافته‌ها: میزان *ROS* میتوکندریایی(۲۲/۱۶±۳۷)، غلظت*MDA* (۱۱/۶±۲۲/۲) و فعالیت آنزیم *LDH*(۷/۴±۳۶۸۰) در طول نگه‌داری پلاکت‌ها، به‌صورت معناداری افزایش یافته بود *(P<0.001)*. از طرف دیگر ، شمارش پلاکت‌ها نیز به‌صورت معناداری کاهش یافته بود. غلظت متابولیت‌های نیتریک اکسید (نیترات و نیتریت) در روزهای نگه‌داری پلاکت تغییر چندانی را نشان نمی‌داد (P>0.05).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو در طول مدت نگه‌داری پلاکت‌ها به وقوع پیوسته که می‌تواند سبب کاهش تعداد پلاکت‌ها و کاهش بقای آن‌ها شود. شاید استفاده از مواد افزودنی آنتی‌اکسیدان در پلاکت‌ها بتواند سبب کاهش آسیب اکسیداتیو و در نتیجه افزایش بقای این فرآورده خونی مهم شود.

واژگان کلیدی: آسیب ذخیره پلاکت، استرس اکسیداتیو، پلاکت کنسانتره، مدت زمان نگه‌داری پلاکت

مقدمه:

امروزه تزریق پلاکت برای درمان بیماران مبتلا به ترومبوستیوپنی، اختلال‌های خونریزی دهنده، شیمی درمانی و همچنین به صورت پیشگیرانه در طول جراحی ضروری است(۱). با توجه به محدود بودن زمان نگه‌داری پلاکت (حداکثر تا پنج روز) که به دلیل شرایط نگه‌داری این فرآورده خونی در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد است، نیاز به پلاکت روز به روز افزایش می‌یابد. آسیب ذخیره پلاکت و آلودگی باکتریایی از دلایل اصلی کاهش طول مدت ذخیره پلاکت‌ها در شرایط بانک خون است(۲).

پلاکت‌ها در مدت ذخیره‌سازی دچار یکسری تغییرهای بیوشیمیایی، عملکردی و مرفولوژیک می‌شوند که به مجموع آن‌ها آسیب ذخیره پلاکت (PSL) گفته می‌شود که سبب کاهش عملکرد و کاهش بقای پلاکت‌ها می‌شود(۵-۳). این تغییرها می‌تواند از زمان جمع‌آوری خون و تهیه کنسانتره پلاکتی تا ذخیره پلاکت‌ها رخ دهد(۳).

استرس اکسیداتیو از علل اصلی تشکیل آسیب‌های ذخیره‌ای پلاکت است(۲). استرس اکسیداتیو به عدم تعادل بین تولید اکسیدانت‌ها و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان پاسخگو در ارگانیسم‌ها گفته می‌شود(۶).

اکسیدان‌ها شامل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) و رادیکال‌های سولفور هستند(۷). گونه‌های فعال اکسیژن شامل آنیون سوپر اکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل(OH^-) و هیدروژن پراکسید(H_2O_2) می‌باشد(۸). تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط فیزیولوژیک به عنوان پیام رسان ثانویه در مسیر

نویسنده مسئول: محمد رضا دیهیم
پست الکترونیک: mrdeyhim@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

پیام‌رسانی (Signaling)، بیان ژن و تکثیر آن نقش دارند(۱۰, ۹)و سپس توسط سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی مثل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، آسکوربیک اسید و گلوتاتیون برداشت می‌شوند(۱۳-۱۱). درشرایط استرس اکسیداتیو، تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر از ظرفیت آنتی اکسیدانی بوده که میتواند سبب آسیب به بیومولکولهایی مانند کربوهیدرات‌ها، DNA، پروتئینها و به خصوص لیپیدهای غشایی شود(۱۴). ROS تولید شده در شرایط استرس اکسیداتیو سبب تغییراتی در غشای خارجی میتوکندری پلاکتها میشود که به دنبال نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و با آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوپلاسم (۱۶, ۱۵) و با فعال شدن آبشار کاسپازی مسیر آپوپتوز فعال می‌شود(۱۷).

لیپیدها مولکول‌های حساس و هدف اکسیدانها هستند و این به دلیل وجود باندهای دوگانه در آنهاست(۱۸). آراشیدونیک اسید یکی از اسید چرب‌های غیر اشباع چند گانه است که در غشای سلولهایی مانند پلاکت‌ها وجود دارد که به عنوان منبع اتم هیدروژن برای رادیکال‌های آزاد است.رادیکال‌های آزاد می‌توانند سبب پراکسیداسیون آراشیدونیک اسید در پلاکت‌ها شده که نتیجه آن تولید ترکیب ناپایداری به نام مالوندآلدئید (MDA) است(۱۹). MDA بیومارکری قوی برای سنجش استرس اکسیداتیو به شمارمی‌آید(۲۱, ۲۰).

یکی دیگر از پارامترهای تحقیق در این مطالعه، اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکسید(نیتریت/نیترات) بود که می‌توانند با تولید نیتریک اکسید در ارتباط باشند. افزایش این متابولیت‌ها می‌توانند سبب اختلال در عملکرد و آگریگاسیون پلاکت‌ها شوند(۲۲). همان‌طور که گفته شد آسیب اکسیداتیو یکی از دلایل وقوع PSL محسوب شده که می‌تواند سبب کاهش بقا و کاهش عملکرد پلاکت‌ها در طول مدت زمان نگه‌داری شود. به همین دلیل، ما در این تحقیق به بررسی پارامترهای استرس اکسیداتیو در پلاکت‌ها در طول زمان نگه‌داری پرداختیم. این تحقیق در سال ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات انتقال خون ایران انجام شده است.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه از نوع تجربی بود. خون در داخل کیسه‌های نگه‌داری که از جنس پلی وینیل کلراید (PVC) و دارای محلول ضد انعقاد سیترات بافر-دکستروز-آدنین (CPDA) بود جمع آوری شد. سپس برای تهیه پلاکت کنسانتره از خون کامل از روش PRPهای نمونه ها کاملا به صورت تصادفی انتخاب شد و هیچ انتخابی در مورد گروه خونی کیسه های پلاکت انجام نشد، اما کیسه‌ها از نظر شکل ظاهری و حجم بررسی شدند تا در شرایط استاندارد باشند.

در روزهای اول، سوم، پنجم و هفتم نگه داری پلاکت، از هر کیسه حاوی پلاکت کنسانتره که بود، به میزان پنج میلی‌لیتر در هر روز نوبت نمونه برداری، برای انجام آزمایش‌ها نمونه‌گیری به عمل آمد. تمامی مراحل نمونه‌برداری تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس ۲ (بعثت -BSC 126) انجام شد.

انتخاب روزهای اول، سوم ، پنجم و هفتم برای نمونه‌برداری، براساس مطالعه‌های مشابه در این زمینه انجام گرفته است(۲۳).پس از پایان هر جلسه نمونه‌برداری، پلاکت‌ها دوباره به انکوباتور پلاکتی (دانش پژوهش فجر) انتقال داده می‌شد. اندازه‌گیری شمارش سلولی در ابتدا به مقدار۱۰۰ میکرولیتر از پلاکت کنسانتره برداشته و برای شمارش پلاکت و اندازه‌گیری اندکس MPV از دستگاه شمارشگر سلولی (Japan-Sismex-K1000) استفاده و تعداد پلاکت‌ها قرائت شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم LDH:

بدین منظور ۱ میلی لیتر از پلاکت کنسانتره برداشته و در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و پلاسما جداشد. فعالیت آنزیم LDH با استفاده از اتوآنالایزر شیمی (Hitachi 911, Japan) ، در هر نمونه اندازه گیری شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم LDH در کنسانتره های پلاکتی از کیت شرکت پارس آزمون استفاده شد که بر اساس واکنش تبدیل پیروات به لاکتات است که توسط آنزیم LDH کاتالیز می شود. در این واکنش آنزیمی، که درآن NADH به NAD تبدیل می شود تغییرات جذب نوری در واحد زمان و در طول موج ۳۴۰ نانومتر محاسبه شد.

روش اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدهید(MDA)

مالون دی آلدهید (MDA) اصلی‌ترین فرآورده پر اکسیداسیون (Lipid peroxidation) اسیدهای چرب غیر اشباع چند گانه است. اساس اندازه‌گیری MDA واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید است. تیوباربیتورات در PH پایین و دمای بالا (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) با MDA ترکیب می‌شود. در این واکنش پس از اینکه پروتئین‌ها توسط تری کلرو استیک اسید (۲۰درصد) رسوب داده شدند، اسیدهای چرب غیر اشباع که اکسیده شده‌اند با تیوباربیتوریک اسید(۰,۶درصد) وارد واکنش شده که نتیجه این واکنش ایجاد کمپلکس رنگی بوده که میزان جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط الیزا ریدر (Hiperion، Germany) قرائت شد، این میزان جذب با استفاده از منحنی استاندارد (MDA) تبدیل به غلظت بر اساس نانومول بر لیتر شد(۳).

اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های نیتریک اکسید (نیترات/ نیتریت):

تعیین مقدار متابولیت‌های نیتریک اکسید، با روش رنگ سنجی معرف گریس انجام شد. واکنش گریس شامل تشکیل یک کروموفور از دیازو شدن سولفانیل آمید توسط نیتریت اسیدی و به دنبال آن جفت شدن با آمین‌های دو حلقه‌ای نظیرN-نفتیل اتیل دی-آمین و در نهایت تولید رنگ ارغوانی است. این رنگ در طول موج nm۵۴۰ دارای حداکثر جذب نوری است. قبل از سنجش، نمونه ها دِپروتئینه شدند. برای این کار از سولفات روی اشباع شده ۵درصد و سدیم هیدروکسید ۰,۳ مولار استفاده شد. نمونه‌ها، به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در دمای اتاق اکوبه شدند، سپس در سانتریفوژ یخچال‌دار با دور g ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای انجام سنجش نیتریت، نیترات‌های پلاسما با یک احیا کننده شیمیایی به نام وانادیوم تری کلراید به نیتریت تبدیل شده و سپس کل نیتریت محیط با استفاده از معرف گریس اندازه‌گیری شد.

برای این کار به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما و ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه پلیت در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفت، سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر وانادیوم تری کلراید اضافه کرده و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

پس از آن جذب نوری رنگ تولید شده توسط الایزا ریدر (Hiperion، Germany) در ۵۴۰ نانومترخوانده شد و بر اساس منحنی استانداردی که از قبل آماده شده بود، غلظت متابولیت‌ها به دست آمد(۲۴).

بررسی ROS میتوکندریایی توسط فلوسایتومتری

برای انجام آزمایش ROS میتوکندریایی از کیت mitochondrial ROS activity assay kit ازشرکت eEnzyme کشور انگلستان استفاده شد. در این روش با استفاده از رنگ دی هیدرواتیدیوم که قابلیت نفوذپذیری به میتوکندری سلول را دارد، در حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژن اکسیده شده و نور فلورسانسی که از خود تشعشع می‌کند توسط دستگاه فلوسایتومتری آنالیز شده و به این ترتیب سلول‌های ROS مثبت مشخص می‌شوند.

در این سنجش، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر PRP از هر کیسه برداشته و نمونه‌ها در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اطاق سانتریفیوژ شدند، سپس محلول رویی دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر محلول تایرود به پلاکت ها اضافه شد و خوب مخلوط شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از نمونه ها برداشته شد و به میکروتوپ جدید انتقال یافت و سپس به آن‌ها یک سی سی محلول تایرود اضافه شد.

لازم به ذکر است که در این مرحله تعداد در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از working solution به آن‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ، حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شد و قبل از خوانش نمونه‌ها با فلوسایتومتری به منظور Gating پلاکت‌ها پنج میکرولیتر از Anti CD 61 کونژوگه به FITC (BD,USA) به آن‌ها اضافه شد و سپس با فلوسایتومتری (Partec-Pas III, Germany) ارزیابی شدند. برای حذف باندهای غیر اختصاصی، از آنتی بادی ایزوتیپ کنترل استفاده شد.

در این روش برای القای ROS در نمونه کنترل مثبت از محلول H_2O_2 با غلظت ۱۰۰ میلی مولار استفاده شد. کنترل منفی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های سانتریفیوژ شده بود که بدون اضافه کردن working solution مورد ارزیابی فلوسایتومتری قرار گرفت.

در این روش، ابتدا کل جمعیت سلولی را بر اساس سایز(FSC) با ولتاژ ۱۹۲ و گرانولیتی(SSC) با ولتاژ ۱۴۵ جدا شد، سپس جمعیت سلولی پلاکتها روی FL1 با ولتاژ ۵۲۰ جدا و همچنین میزان ROS میتوکندریال روی FL۳ با ولتاژ ۵۰۰ جدا شدند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

جدول۱: بررسی میزان پارامترهای تحقیق در پلاکت‌ها در طول مدت نگه‌داری تا ۷ روز و به تفکیک گروه‌ها

پارامترهای تحقیق	روزهای ذخیره سازی پلاکت				P value
	روز ۱ نگه داری n=10	روز۳ نگه داری n=10	روز ۵ نگه داری n=10	روز ۷ نگه داری n=10	
شمارش پلاکت‌ها ($x10^3/\mu l$)	۹۵۰±۲۹۶	۷۴۵±۳۵۳	۵۷۸±۳۶۳	۴۳۹±۳۱۰	۰,۰۰۱
میانگین حجم پلاکت (MPV) (fl)	۷,۹±۰,۲۶	۸,۳±۰,۴	۷,۶±۰,۶	۶,۰۹±۰۹	۰,۰۰۱
مالون دآلدئید(نانو مول)	۱۱,۴±۲,۵۴	۱۴,۲±۵,۶	۱۵,۴±۹,۲	۲۲,۲±۱۱,۶	۰,۰۰۱
متابولیت های نیتریک اکسید(میکرومول)	۱۳,۳۲±۴,۰۸	۱۳,۱۸±۴,۸۵	۱۳,۱۹±۵,۰۷	۱۳,۱۳±۵,۰۲	۰,۳۱۸
گونه های فعال اکسیژن (%)	۷,۳۸±۳,۷۳	۲۳,۶۸±۹,۴۹	۳۹,۱۹±۱۱,۲	۳۷±۱۶,۲۲	۰,۰۰۱
فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروزناز (IU/L)	۹۲۷±۳۶۴	۲۳۴۸±۷۳۳	۳۲۳۰±۸۶۶	۳۶۸۰±۷۱۴	۰,۰۰۱

آنالیز آماری:

تمامی داده‌ها وارد نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ شد. قبل از شروع آزمون‌های آماری و استنباط روی داده‌ها، نرمال بودن توزیع متغیرها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف انجام شد. طبق این آزمون تمامی متغیرها دارای توزیع نرمال بودند. برای توصیف داده‌ها از آزمون‌های واریانس یکطرفه (one way Anova)استفاده کردیم و مقادیر (P-Value <0.05)ازنظرآماری معنادار درنظرگرفته شد.

یافته‌ها:

بررسی شمارش پلاکتی و میانگین حجم پلاکت (MPV)

نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس ، نشان‌دهنده کاهش معنادار تعداد پلاکت‌ها در طول زمان نگه‌داری است. یعنی تعداد پلاکت‌ها در روزهای مختلف اندازه‌گیری با یکدیگر تفاوت معناداری داشتند (P=۰/۰۰۱). نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس، نشان‌دهنده کاهش معنادار در میانگین حجم پلاکت‌ها در طول زمان نگه‌داری بود، یعنی میانگین حجم پلاکت‌ها در روزهای مختلف اندازه‌گیری با یکدیگر تفاوت معنادار داشتند (P =۰/۰۰۱)، (جدول ۱). در جدول یک تمامی داده‌های مربوط به متغیرهای تحقیق با ذکر میانگین و انحراف معیار آورده شده است.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)

نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس، نشان‌دهنده این بود که در طول زمان، فعالیت آنزیم LDH افزایش یافته بود . یعنی فعالیت آنزیم LDH در روزهای مختلف اندازه‌گیری با یکدیگر تفاوت معناداری داشت (P =۰/۰۰۱)(جدول ۱).

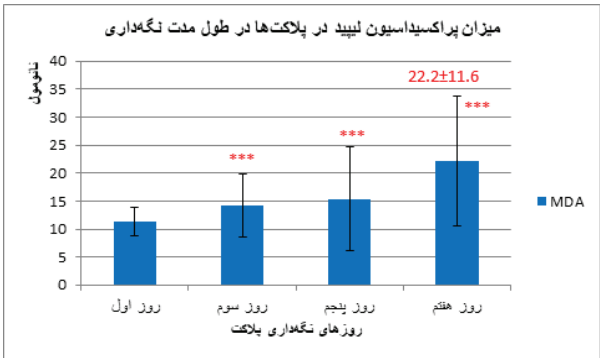
بررسی متابولیت‌های نیتریک اکسید(نیتریت/نیترات)

نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس، نشان‌دهنده این است که در طول زمان، غلظت متابولیت‌های نیتریت/نیترات اختلاف معناداری نداشته، یعنی غلظت متابولیت‌های نیتریت/نیترات در روزهای مختلف اندازه‌گیری با یکدیگر تفاوت معنادار را نشان نداد (P =۰/۳۱۸)(جدول ۱).

سنجش غلظت مالون دی آلدهید(MDA) و ROS

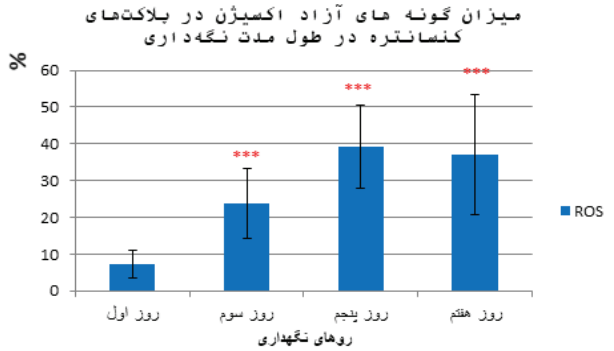
نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس، نشان‌دهنده افزایش معنادار غلظت MDA در پلاکت‌ها در طول زمان نگه‌داری بود، یعنی غلظت MDA در روزهای مختلف اندازه‌گیری با یکدیگر تفاوت معنادار داشت (P = ۰/۰۰۱)(جدول ۱، نمودار ۱).

میزان تولید ROS با استفاده از کیت Deep Red Flourcence توسط روش فلوسایتومتری سنجیده شد که در ابتدا از میان کل جمعیت سلول‌ها ، جمعیت پلاکتی با anti CD61 جدا شد (شکل۱) و برای مقایسه میزان ROS در پلاکت‌ها از این جمعیت سلولی جداشده استفاده شد. طبق نتایج به‌دست آمده میزان ROS درطول مدت نگه‌داری در پلاکت‌ها افزایش یافته بود. نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس،



نمودار ۱: میزان تغییر غلظت MDA در پلاکت‌ها در طول مدت نگه‌داری

نشان‌دهنده این بود که در طول زمان و روزهای مختلف اندازه‌گیری، میزان ROS اختلاف معناداری را نشان می‌داد (P =۰/۰۰۱)(جدول ۱، نمودار ۲).

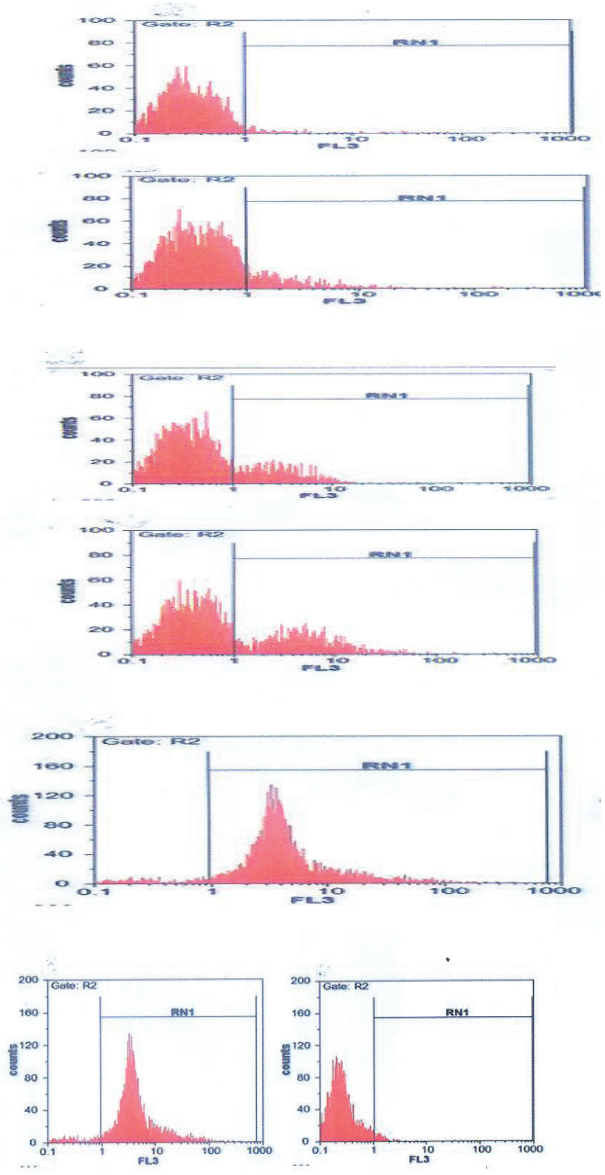


نمودار ۲ : میزان تغییر ROS در پلاکت‌ها در طول مدت نگه‌داری

بحث:

یکی از دلایل وقوع آسیب ذخیره پلاکت، آسیب اکسیداتیو در این سلول در طول مدت نگه داری است. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، مشخص شد که میزان تولید ROS میتوکندریال در پلاکت ها در طول مدت نگه‌داری افزایش

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]



شکل ۱: بررسی میزان تولید ROS در پلاکت‌ها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری: A: میزان تولید ROS در روزاول نگه‌داری پلاکت ، B: میزان تولید ROS در روزسوم نگه‌داری پلاکت، C: میزان تولید ROS در روزپنجم نگه‌داری پلاکت ، D: میزان تولید ROS در روزهفتم نگه‌داری پلاکت ، E: پلاکت کنترل مثبت تیمار با H_2O_2 ، F: پلاکت کنترل مثبت، G: پلاکت کنترل منفی (بدون تیمار با H2O2)

می‌یابد و این افزایش در میزان تولید ROS در روزهای سوم به بعد نگه‌داری پلاکت‌ها به مراتب بیشتر از روزهای اولیه نگه‌داری پلاکت است. نکته قابل توجه که در این مطالعه مشاهده شد، کاهش میزان ROS در روز هفتم نسبت به روز پنجم بودکه این نتایج با نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ انجام شده بود، مطابقت داشت. این محقق کاهش ROS را درروز هفتم دلیل بر این دانست که ممکن است در مدت زمان، فعالیت میتوکندری به طور کامل مهار شده باشد(۲۵).

یکی از دلایلی که منجر به افزایش میزان ROS در پلاکت‌ها می‌شود، می‌تواند مرتبط با شرایط هیپوکسی در پلاکت‌ها که در طول مدت نگه‌داری ایجاد می‌شود، باشد. در این رابطه نقش آنزیم NADPH اکسیداز در تولید ROS بسیار حائز اهمیت است (۲۷،۲۶).

Manasa و همکارانش در سال۲۰۱۶ بیان کردند که استرس اکسیداتیو یکی از فاکتورهای اصلی در کاهش کیفیت و نیمه عمر پلاکتها بوده که می تواند با افزایش تولید ROS همراه بوده و درنهایت سبب افزایش فعال شدن پلاکت ها در طول مدت نگه داری شود (۱). Violi نیز در مطالعه‌ای به این موضوع اشاره کرد که ROS در فعال‌سازی پلاکت نقش عمده‌ای را به عهده دارد(۲۸).

LOOR و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مکانیسم دپلاریزه شدن غشا و مرگ سلولی را در سلول‌های دچار استرس اکسیداتیو با شرایط ایسکمی در ماتریکس میتوکندریال با روش فلوسایتومتری بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش تولید ROS میتوکندریایی سبب ایجاد تغییرهایی در نفوذ پذیری غشای سلول شده که به دپلاریزاسیون غشای میتوکندری و در نتیجه مرگ سلولی و آپوپتوز منجر می‌شود(۳۰).

یکی دیگراز بیومارکرهای آسیب اکسیداتیو که در این مطالعه ارزیابی شد، استفاده از شاخص MDA برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها بود. آراشیدونیک اسید یکی از اسیدهای چرب غیر اشباع چند گانه است که در غشای پلاکت‌ها وجود دارد و به عنوان منبع اتم هیدروژن برای رادیکالهای آزاد است. بنابراین، رادیکال‌های آزاد می‌توانند سبب پراکسیداسیون آراشیدونیک اسید در پلاکت‌ها شده که نتیجه آن تولیدMDA است. طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه، نشان داده شد که غلظت MDA در طول مدت نگه‌داری پلاکت‌ها افزایش می‌یابدکه یکی دیگر از نشانه‌های آسیب اکسیداتیو در پلاکت‌هاست و به این معنی است که در طول مدت نگهداری، لیپیدهای غشای پلاکت دچار آسیب شده بودند. در مطالعه‌های بسیاری MDA را به عنوان شاخصی از استرس اکسیداتیو در نمونه‌های بیولوژیک مطرح کرده اند (۳۳-۳۱). در سال‌های ۱۹۸۹و۱۹۹۲ و بطور جداگانه در دو مطالعه، ارتباط بین افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و luliano اختلال عملکرد پلاکتی را در کنسانتره پلاکتی بررسی کردند(۳۵،۳۴).

Goker و همکاران نیز در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ در ارتباط با تغییر اکسیداتیو در پلاکت‌های کنسانتره انجام دادند، نتایج مطالعه نشان می‌داد که افزایش پراکسیداسیون لیپیدها به همراه فعال شدن آن‌ها در طول مدت نگه‌داری، می‌تواند سبب القای آپوپتوز در سلول شده و با افزایش فعالیت پیش انعقادی (procoagulan) پلاکت‌ها، ریسک ابتلا به ترومبوز را در دریافت کنندگان پلاکت افزایش دهد(۳).

یکی دیگراز پارامترهای تحقیق در این مطالعه بررسی فعالیت آنزیم LDH بود. لاکتات دهیدروژناز یکی از فاکتورهایی است که می‌تواند به عنوان شاخص مهمی برای حفظ و سلامتی غشای سلول مطرح باشد و زمانی‌که غشای سلول آسیب دیده باشد، آنزیم LDH از سیتوزول آزاد شده و به داخل پلاسما نشت می‌کند و می‌توانیم افزایش آن را در محیط پلاسمایی شاهد باشیم. نتایج این مطالعه نشان می داد که فعالیت آنزیم LDH در پلاسما افزایش یافته که این خود می‌تواند آسیب به غشای پلاکت‌ها را در طول مدت نگه‌داری نشان دهد که به احتمال در فاصله نگه‌داری پلاکت‌ها ، با لیز این سلول‌ها روبه‌رو هستیم و این خود یکی دیگر از تغییرهایی است که در پدیده PSL اتفاق افتاده و سبب کاهش بقای پلاکت‌ها می‌شود.Deyhim همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۵ انجام دادند بیان کردند که کاهش در آزاد شدن آنزیم LDH از سیتوپلاسم و تامین اکسیژن کافی برای متابولیزم پلاکت، هر دو از عوامل مهم برای حفظ بقا و حفظ کیفیت پلاکت کنسانتره در طول مدت نگه داری است.(۲۳) Izadpanahi و همکاران نیز در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، افزایش فعالیت آنزیم LDH را در کنسانتره‌های پلاکتی در طول مدت نگه‌داری مشاهده کردند و این افزایش در میزان آنزیم را مرتبط با آسیب سلول‌ها در طول مدت زمان نگه‌داری بیان کردند.(۳۷)

طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، شمارش پلاکت‌ها (که یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی بقای پلاکت‌ها است) در طول مدت نگه‌داری پلاکت‌ها کاهش می‌یابد. از طرف دیگر، میانگین حجم پلاکت‌ها (MPV) نیز که به عنوان شاخصی برای ارزیابی مرفولوژی پلاکت‌ها به کار می‌رود (۳۹،۳۸)، در طول مدت نگه‌داری پلاکت‌ها کاهش یافته بود. کاهش تعداد پلاکت‌ها و تغییرهای مرفولوژیک، هر دو یک بار دیگر حاکی از کاهش بقا وکاهش کیفیت پلاکت‌ها در طول مدت نگه‌داری است. طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه، غلظت متابولیت‌های نیتریک اکسید (نیترات و نیتریت) در نگه‌داری پلاکت‌ها تغییر چندانی را نشان نداد. افزایش این متابولیت‌ها

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

در سلول می‌تواند برعملکرد پلاکت‌ها تاثیرگذار باشد و سبب مختل شدن آگریگاسیون آن‌ها شود(۲۲) و با توجه به نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد با ثابت ماندن این متابولیت‌ها در دوران نگه‌داری، این مسیر تغییرهای چندانی را برعملکرد و آگریگاسیون پلاکت‌ها در طول مدت نگه‌داری نداشته باشد.

طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه، می‌توان بیان کرد که شاخص‌های آسیب اکسیداتیو می‌توانند در ارزیابی کیفی پلاکت‌ها در دوران ذخیره‌سازی مورد توجه قرار گیرند. در این رابطه، یکی از راهکارهای موجود برای کاهش یا حذف رادیکال‌های آزاد در ذخیره‌سازی پلاکت‌ها، استفاده از مواد افزودنی آنتی اکسیدان است که می‌توانند با کاهش استرس و اسیب اکسیداتیو به ارتقای پلاکت‌ها در طول مدت ذخیره‌سازی کمک کنند. در این خصوص استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ان-استیل-سیستئین (NAC) و ال-کارنیتین می‌توانند با نقش محافظتی خود در مقابله با آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد سبب حفظ بقا و کیفیت پلاکت‌ها در طول مدت ذخیره‌سازی شوند (۴۱-۴۳).

در این میسرشاید در آینده بتوان با اندازه‌گیری شاخص‌های آاسیب اکسیداتیو در پلاکت‌ها در دوران ذخیره‌سازی، به بهبود کیفیت این فرآورده مهم خونی قبل از تزریق آن به بیماران نیازمند به پلاکت کمک کرد.

نتیجه گیری:

نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد که آسیب اکسیداتیو پلاکت‌ها از روز دوم نگهداری پلاکت‌های کنساتره به بعد افزایش چشم‌گیری داشته و احتمال پلاکت‌هایی که چند روز پس از تهیه آنها به بیماران تزریبق می گرددممکن است که با کاهش عملکرد یا با کاهش بقاء روبه رو باشند که در نتیجه اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش آپوپتوز در اثر آسیب اکسیدایو می‌باشد این مسئله از نظر کلینیک بسیار حائز اهمیت بوده و نیاز به مطالعه بیشتری دارد

تشکر و قدردانی:

این پروژه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است که در آبان ماه سال ۱۳۹۵در شورای پژوهشی موسسه آموزش عالی طب انتقال خون به تصویب رسیده است.

از معاونت آموزشی و پژوهشی مؤسسه آموزش عالی طب انتقال خون و همکاران محترم در پایگاه انتقال خون استان تهران که همکاری لازم را برای اجرای این پروژه داشته‌اند و همچنین از همکاران شاغل در آزمایشگاه‌های بیوشیمی، هماتولوژی و مرکز نوآوری سازمان انتقال خون نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع:

1. Manasa K, Vani R. Influence of oxidative stress on stored platelets. Advances in hematology. 2016;: 1-6

2. Vani R, Soumya R, Manasa K, Carl H. Storage lesions in blood components. Oxidants and Antioxidants in Medical Science. 2015; 4(3): 125-131

3. Seghatchian J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. Transfusion medicine reviews. 1997; 11(2):130-44.

4. Seghatchian J, Krailadsiri P. Platelet storage lesion and apoptosis: are they related? Transfusion and Apheresis Science. 2001; 24(1):103-5.

5. Martín-Valmaseda EM, Sánchez-Yagüe J, Rodríguez MC, Gómez FP, Llanillo M. Comparison between in vitro lipid peroxidation in fresh sheep platelets and peroxidative processes during sheep platelet ageing under storage at 4 C. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1999; 1419(2):313-24.

6. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals, other reactive species and disease. Free radicals in biology and medicine. 1999; 3:617-783.

7. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica chimica acta. 2001; 306(1-2):1-17.

8. Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi K, Hayashi T. High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2007; 631(1):55-61.

9. Bryan N, Ahswin H, Smart N, Bayon Y, Wohlert S, Hunt JA. Reactive oxygen species (ROS)–a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. Eur Cell Mater. 2012;24: 249-65

10. Wang G-W, LV C, Shi Z-R, Zeng R-T, Dong X-Y, Zhang W-D. Abieslactone induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinomas through the mitochondrial pathway and the generation of reactive oxygen species. PLoS One. 2014;9(12):1-19

11. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell. 2005; 120(4):483-95

12. Bolisetty S, Jaimes E. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. International journal of molecular sciences. 2013; 14(3):6306-44.

13. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews. 2002; 82(1):47-95

14. Ho E, Galougahi KK, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. Redox biology. 2013; 1(1):483-91

15. Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. Lipids. 1995; 30(4):277-90

16. Singh Z, Karthigesu IP, Singh P, Rupinder K. Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. Iranian Journal of Public Health. 2015;43(3):7-16

17. Horton A, Fairhurst S, Bus JS. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. CRC Critical Reviews in Toxicology. 1987; 18(1):27-79

18. Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. The Tohoku journal of experimental medicine. 2004; 203(3):211-8

19. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science. 1998;281(5381):1309-12

20. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. Nature medicine. 2000; 6(5):513

21. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell. 1997; 91(4):479-89

22. Won Park Ji, Piknova B, James Kurtz J, Shalini J. Wagner S. Effect of storage on levels of nitric oxide metabolites in platelet Preparations. Transfusion. 2013; 53(3): 637–644

23. Deyhim MR, Mesbah-Namin SA, Yari F, Taghikhani M, Amirizadeh N. L-carnitine effectively improves the metabolism and quality of platelet concentrates during storage. Annals of hematology. 2015; 94(4):671-80.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

24. Bryan N.S, Grisham M. Methods to detect nitric oxide and metabolites in biological samples. Free radical biology and medicine. 2007; 43: 645-657

25. Dikalov S. Cross talks between mitochondria and NADPH oxidases. Free Radic Biol Med. 2011; 51(7):1289–301

26. Skripchenko A, Myrup A, Thompson-Montgomery D, Awatefe H, Moroff G, Wagner SJ. Periods without agitation diminish platelet mitochondrial function during storage. Transfusion. 2010; 50:390–99

27. Fletcher NM, Jiang ZL, Diamond MP, Abu-Soud HM, Saed GM. Hypoxia-generated superoxide induces the development of the adhesion phenotype. Free Radic Biol Med. 2008; 45:530–6

28. Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. Thrombosis research. 2012; 129(3):378-81.

29. Ghasabeh A.Sh, Ghasemzadeh M, Hosseini E. Reactive oxygen species generation as marker of platelet activation in PRP derived platelet concentrate during storage. Tehran University Medical Journal. 2016;74(9):669-74

30. Loor G, Kondapalli J, Iwase H, Chandel NS, Waypa GB, Guzy RD. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia–reperfusion. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2011; 1813(7):1382-94

31. Jetawattana S. Malondialdehyde (MDA), a lipid oxidation product. Free Radicals in Biology and Medicine the University of Iowa. 2005; 72(222):1-1.

32. Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quimica Nova. 2009; 32(1):169-74

33. Singh Z, Karthigesu IP, Singh P, Rupinder KA. Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. Iranian Journal of Public Health..

34. Iuliano L, Violi F, Pedersen JZ, Praticò D, Rotilio G, Balsano F. Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells. Archives of biochemistry and biophysics. 1992; 299(2):220- 4

35. Fagiolo E, Lippa S, Mores N, Oradei A, Aureli V. Peroxidative Events in Stored Platelet Concentrates. Vox sanguinis. 1989; 56(1):32-6

36. Izadpanahi HA, Yari F , Khorramizadeh MR, Maghsudlu M. Evaluation of Biochemical Parameters of Platelet concentrates stored in Plasma or in A Platelet Additive Solution Composol38.

37. S.M.Picker. In-vitro assessment of platelet function .Transfusion and apheresis science 2011; 44: 305-3

38. R .Fijnheer, RN .Pietersz, D .Korte, D. Ross. Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. Transfusion 1989, 2936-40

39. Feys H, Vandekerckhove Ph, Compernolle V. Nitric oxide levels increase during platelet

40. concentrate production from buffy coats, but no during storage. transfusion. 2013;223-234 Hundigund M, Bae TW, Lee J,Cho YG. Evaluation of in vitro storage characteristics of cold stored platelet concentrates with N acetylcysteine (NAC).Transfus Apher Sci. 2016;54(1):127-38

41. Saluk-Juszczak J, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E. L-carnitine modulates blood platelet oxidative stress. Cell biology and toxicology. 2010; 26(4):355-65.

42. kolodziejczyk L, Saluk-Juszczak, Washowicz B.L-carnitine protects plasma components against oxidative alternations. Nutrition. 2011;27(6):693-699

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]