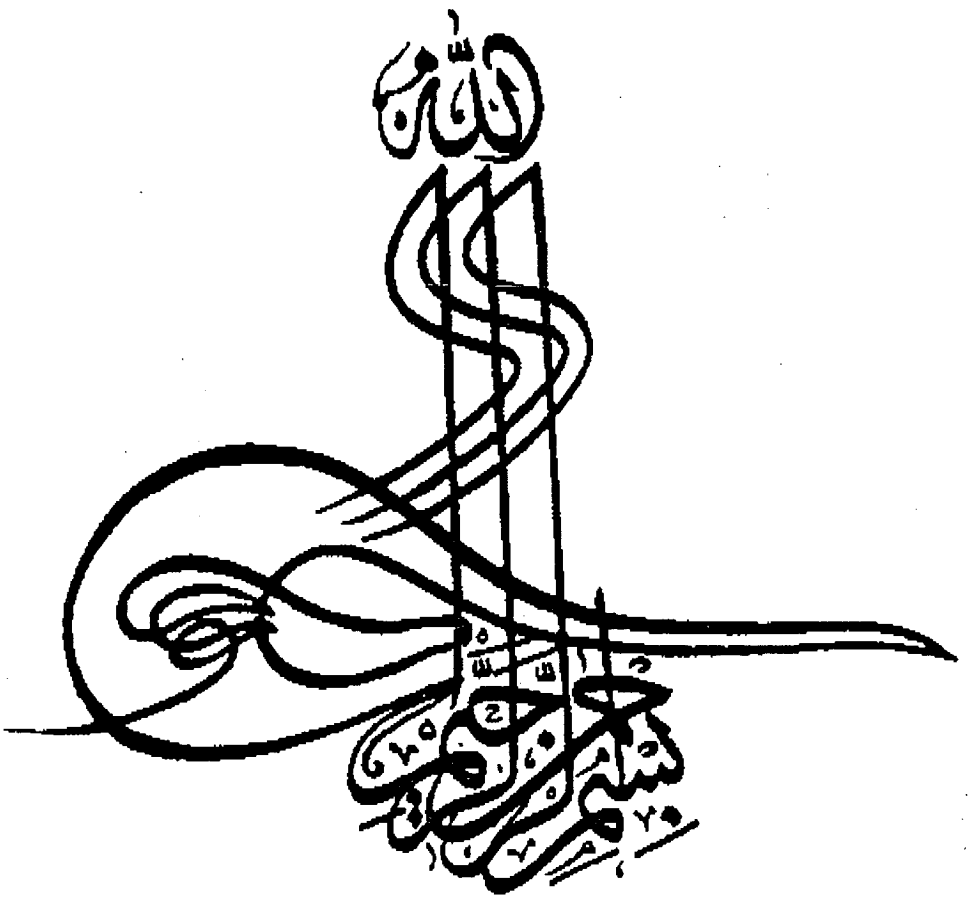
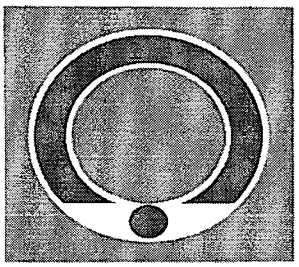


١٥٩٨٧٥



سازمان انتقال خون ایران

موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد خون شناسی و انتقال خون

عنوان:

بررسی امکان استفاده از لیپوکالین-۲ نوترکیب انسانی به عنوان عامل مهار کننده رشد باکتری‌ها در جلوگیری از آلودگی پلاکتی

Study of potential application of Recombinant Human Lipocalin 2 as an antibacterial agent to prevent platelet contamination

استاد راهنما: دکتر مهریار حبیبی رودکنار

اساتید مشاور: دکتر ناصر امیری زاده، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی

نگارنده: زهرا بخشنده

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
IRANDOC

شماره پایان نامه: ۶۷

اسفند ۱۳۸۹

۱۵۹۵۷۵

۱۳۹۰/۳/۲۲

تقدیم به مادر عزیزم

به پاس محبت‌های بی‌دریغش

که هرگز فروکش نمی‌کند

با تشکر و قدردانی از:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر مهریار حبیبی رودکنار که در سایه راهنمایی و کمک‌های بی دریغ ایشان این پایان نامه به انجام رسید.

اساتید مشاور محترم، جناب آقای دکتر ناصر امیری زاده و دکتر عباسعلی ایمانی فولادی که از راهنمایی‌های علمی ایشان برای انجام هر چه بهتر این پایان‌نامه بهره‌مند شدم.

معاون محترم آموزشی و پژوهشی جناب آقای دکتر قره باغیان

همکاران محترم بخش آموزش سرکار خانم‌ها: دکتر خدیر، دکتر مهران، دکتر میری، مقصودی و حمزه

دوستان عزیزم در بخش مرکز تحقیقات سرکار خانم‌ها: محمدی پور، حلبیان، امانی، دکترزاده و سایر دوستان که نهایت همکاری را در این مدت با بنده داشتند.

مسئولین محترم کتابخانه سرکار خانم‌ها: دهقان، مختاری و رمضانی

کلیه اساتیدی که در طی دوره تحصیلی خود در سازمان انتقال خون به نوعی از محضر آن‌ها بهره‌مند شدم.

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

چکیده پژوهش .....

۱- دلایل انتخاب موضوع ۱

۲- بیان مسئله ۳

۳- بازنگری منابع و اطلاعات موجود ۷

۳-۱- تاریخچه موضوع ۷

۳-۲- پلاکت ۷

۳-۲-۱- ساختار پلاکت‌ها ۸

۳-۲-۲- فعالیت پلاکت‌ها در هموستاز و انعقاد ۸

۳-۲-۳- انواع کنسانتره های پلاکتی ۹

۳-۲-۳-۱- کنسانتره پلاکتی حاصل از آفرزیس (Single Donor Platelets) ۹

۳-۲-۳-۲- کنسانتره پلاکتی تهیه شده از خون کامل (Random Donor Platelets) ۱۰

۳-۳- آلودگی باکتریایی ۱۱

۳-۳-۱- آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها به عنوان خطر انتقال خون ۱۱

۳-۳-۲- علایم بالینی ناشی از انتقال پلاکت آلوده به باکتری ۱۲

۳-۳-۳- منابع آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی ۱۳

۳-۳-۴- باکتری‌های شایع در آلودگی‌های پلاکتی ۱۵

۳-۳-۵- استراتژی‌های کاهش آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی ۱۷

۳-۳-۶- روش‌های تشخیص آلودگی فرآورده‌های پلاکتی ۱۸

۳-۴- صدمات ناشی از ذخیره پلاکت (Platelets Storage Lesion) ۲۱

۳-۴-۱- آپوپتوز در پلاکت‌ها ۲۴

۳-۴-۲- نقش آنزیم‌های کاسپاز در آپوپتوز ۲۵

۳-۴-۳- مارکرهای آپوپتوز در پلاکت‌ها ۲۶

۳-۵- لیپوکالین‌ها ۲۸
۳-۵-۱- لیپوکالین-۲ (Lcn_2) ۲۹
۳-۵-۲- رسپتورهای سطح سلولی لیپوکالین-۲ ۳۰
۳-۵-۳- عملکردهای لیپوکالین-۲ ۳۱
۴- نقد متون ۳۶
۵- اهداف کلی، اهداف اختصاصی، فرضیات ۴۰
۵-۱- هدف کلی ۴۰
۵-۲- اهداف اختصاصی ۴۰
۵-۳- فرضیات ۴۰
۶- متغیرهای تحقیق، ابزار و نحوه سنجش آن‌ها ۴۱
۷- نوع مطالعه ۴۱
۸- جامعه مورد مطالعه، حجم نمونه، روش نمونه‌گیری و آزمون آماری ۴۱
۸-۱- جامعه مورد مطالعه ۴۱
۸-۲- حجم نمونه ۴۲
۸-۳- روش نمونه‌گیری ۴۲
۸-۴- آزمون آماری ۴۲
۹- نحوه اجرای تحقیق ۴۲
۹-۱- فهرست مواد مورد نیاز ۴۲
۹-۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز ۴۳
۹-۳- آماده سازی محلول‌ها ۴۴
۱۰- روش و مراحل انجام پژوهش ۴۸
۱۰-۱- اندازه‌گیری غلظت لیپوکالین-۲ بوسیله ELISA ۴۸
۱۰ -۲- تعیین حساسیت آنتی باکتریایی لیپوکاین-۲ (Lcn-2) ۵۰
۱۰-۲-۱- تهیه ی کدورت استاندارد نیم مک فارلند (۰/۵ Mac) ۵۰
۱۰-۲-۲- تهیه‌ی سوسپانیون باکتری معادل کدورت نیم مک فارلند (۰/۵ Mac) ۵۰

۱۰-۲-۳- تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) لیپوکالین-۲ ..... ۵۱
۱۰-۳- تهیه کنسانتره‌های پلاکتی ۵۲
۱۰-۴- بررسی اثرات آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در محیط پلاکتی ۵۳
۱۰-۴-۱- رقت سازی ۵۴
۱۰-۴-۲- بررسی اثرات آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-2 در محیط پلاکتی ۵۵
۱۰-۵- بررسی آپوپتوز پلاکتی در حضور لیپوکالین-۲ ..... ۵۷
۱۰-۵-۱- کاهش دادن لکوسیت موجود در کنسانتره‌های پلاکتی ۵۷
۱۰-۵-۲- اندازه گیری آنزیم کاسپاز۳ برای بررسی میزان آپوپتوز در پلاکت‌ها ۵۸
۱۰-۶- بررسی انبوهش پلاکتی ۶۰
۱۱- یافته‌ها ۶۲
۱۲- بحث **۸۸**
۱۳- نتیجه‌گیری **۹۴**
۱۴- پیشنهادات ۹۵
۱۵- فهرست منابع ۹۶

چکیده پژوهش

مقدمه:

آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی، خطر عفونی باقیمانده عمده در طب انتقال خون نوین است. این مشکل به‌ویژه در مورد فرآورده‌های پلاکتی که شرایط مطلوب برای رشد باکتری‌ها را فراهم می‌سازند، نگران کننده است. لیپوکالین-۲ یک پروتئین احتباس کننده آهن در پاسخ ایمنی ذاتی است که به سیدروفور باکتری‌ها متصل شده و از جذب آهن توسط آن‌ها جلوگیری می‌کند. این مطالعه برای نشان دادن اثرات آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ به عنوان یک عامل باکتریواستاتیک در جلوگیری از آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها طراحی شده است.

مواد و روش‌ها:

۵۰ واحد فرآورده پلاکتی از سازمان انتقال خون ایران تهیه شد. ابتدا حداقل غلظت مهار کننده لیپوکالین-۲ بر روی رشد ۷ سویه باکتریایی آلوده کننده پلاکتی، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت باکتریایی مایع تعیین شد (با روش رقت لوله‌ای). سپس اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در محیط پلاکتی به دنبال تلقیح رقت‌های مختلف از باکتری‌ها و نگهداری ۴ روزه در دمای اتاق بررسی شد و در نهایت میزان آپوپتوز پلاکت‌های نگهداری شده در دمای اتاق از طریق اندازه‌گیری آنریم کاسپاز ۳ در حضور لیپوکالین-۲ و عدم حضور آن بررسی شد.

یافته‌ها:

نتایج حاصل از کشت فرآورده پلاکتی حاوی لیپوکالین-۲ و رقت‌های مختلف باکتری ها نشان داد که لیپوکالین-۲ در غلظت ۴۰ ng/ml توانست باعث مهار رشد $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$ CFU/ml استافیلوکوک اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروکوکوس فکالیس شود همچنین لیپوکالین-۲ در همین غلظت توانست باعث مهار رشد $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ CFU/ml استافیلوکوک اورئوس و پروتئوس میرابیلیس شود. علاوه بر اثر آنتی باکتریایی، لیپوکالین -۲ باعث کاهش آپوپتوز پلاکت ها به طور معنی دار در طی نگهداری در دمای اتاق شد.

نتیجه‌گیری:

به طور کلی در این تحقیق اثر آنتی‌باکتریایی یک پروتئین طبیعی پلاسما به نام لیپوکالین-۲ مطالعه شد. نتایج بیانگر آن بود که لیپوکالین-۲ نوترکیب، به طور موثر رشد باکتری‌ها را مهار کرده و باعث کاهش آپوپتوز پلاکت‌ها در طی نگهداری در دمای اتاق شد. بنابراین استفاده از لیپوکالین-۲ در کنسانتره‌های پلاکتی ، علاوه بر کاهش آلودگی باکتریایی می‌تواند در کاهش صدمات ناشی از نگهداری پلاکت نقش موثر داشته و باعث افزایش زمان نگهداری پلاکت شود. اگرچه برای استفاده از آن در کلینیک، مطالعات بیشتر و تکمیلی مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: آلودگی باکتریایی پلاکت، لیپوکالین-۲، سیدروفور باکتری، آپوپتوز پلاکتی

۱- دلایل انتخاب موضوع

تزریق پلاکت به منظور پیشگیری و درمان خونریزی در بیماران دارای ترومبوسیتوپنی و یا اختلالات عملکردی پلاکت مورد استفاده قرار می‌گیرد. علی‌رغم پیشرفت‌هایی که در زمینه جمع آوری، تهیه و ذخیره پلاکت‌های کنسانتره به وجود آمده است، عفونت باکتریایی ناشی از انتقال پلاکت‌های آلوده هنوز هم به عنوان یک مشکل جدی در طب انتقال خون مطرح می‌باشد.

در سال‌های اخیر با روش‌های تشخیص مولکولی، خون‌های اهدایی از نظر آلودگی به عفونت‌های ویروسی غربالگری می‌شوند به طوری که با انجام تدابیری مثل گزینش دقیق اهدا کنندگان در مراکز انتقال خون و انجام آزمایش‌های غربالگری به طور موثری از انتقال عوامل ویروسی جلوگیری شده است. ولی باکتری‌ها با این که از قدیمی‌ترین عوامل شناخته شده ایجاد عفونت در اثر انتقال خون بوده‌اند، امروزه معمول‌ترین خطر ابتلا به عفونت در اثر تزریق خون بوده و در مواردی تهدیدکننده‌تر از ویروس‌ها می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهند که در حدود ۱ واحد از ۳۰۰۰-۲۰۰۰ کنسانتره پلاکتی، آلوده به باکتری می‌باشد. در آمریکا سپتیسمی ناشی از فرآورده‌های آلوده به باکتری بعد از ناسازگاری ABO، دومین علت شایع مرگ ومیر ناشی از فرآورده‌های خونی می‌باشد که دارای رنج مرگ ومیر ۱/۸۵۰۰۰- ۱/۲۰۰۰۰ می‌باشد.

شیوع بالای آلودگی باکتریایی در کنسانتره‌های پلاکتی به علت نگهداری آن‌ها در دمای اتاق (۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد) است که یک محیط مناسب برای رشد باکتری‌ها را فراهم می‌سازد. به طوری که اگر کمترین تعداد باکتری‌ها (۱-۱۰ CFU/ml) بتواند وارد کیسه شود در طی نگهداری در دمای اتاق رشد و تکثیر کرده و به غلظت بسیار بالا (بیشتر از ۱×۱۰^{۸} CFU/ml) می‌رسد.

باکتری‌ها اغلب در طی مرحله خونگیری وارد کیسه می‌شوند و اکثراً فلور طبیعی پوست می‌باشند، به همین علت اگر از همان ابتدا یک عامل باکتریواستاتیک در محیط پلاکتی وجود داشته باشد، حتی در صورت تلقیح تعداد کمی از باکتری مانع رشد و تکثیر آن خواهد شد. به دلیل این که فرآورده پلاکتی مصرف تزریقی دارد نمی‌توان از آنتی‌بیوتیک‌ها در داخل کیسه استفاده کرد. بنابراین استفاده از یک پروتئین طبیعی بدن انسان به نام لیپوکالین-۲ که به صورت نوترکیب تهیه شده است و خاصیت باکتریواستاتیک دارد، راه حل مناسبی به نظر می‌رسد. همه باکتری‌ها برای رشد و تکثیر نیاز به عنصر ضروری آهن دارند و لیپوکالین-۲ با مکانیسم جذب آهن در باکتری‌ها، تداخل کرده و مانع رشد آن‌ها می‌شود.

۲- بیان مسئله

فرآورده‌های خونی به ویژه کنسانتره‌های پلاکتی در خطر آلودگی باکتریایی قرار دارند، به خاطر این که دمای نگهداری آن‌ها، ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد است و این دما، درجه حرارت مناسب برای رشد باکتری‌ها می‌باشد (۱، ۲). با وجود این‌که باکتری‌ها قدیمی‌ترین عوامل شناخته شده ایجاد کننده عفونت در اثر انتقال خون می‌باشند، امروزه به عنوان شایع‌ترین خطر ابتلا به عفونت در اثر تزریق خون بوده و در مواردی تهدیدکننده‌تر از ویروس‌هایی مثل ویروس نقص ایمنی انسان و ویروس هپاتیت می‌باشند (۱، ۳)، به طوری که خطر دریافت کنسانتره‌های پلاکتی آلوده به باکتری ممکن است ۲۵۰-۵۰ برابر بیشتر از خطر مجموع عفونت‌های ایدز و هپاتیت‌های B، C و عفونت‌های HTLV1,2 باشد و باکتری‌ها در مقایسه با ویروس‌ها علت اصلی مرگ و میر ناشی از انتقال فرآورده‌های خونی می‌باشند (۴).

در حال حاضر میزان آلودگی باکتریایی کنسانتره‌های پلاکتی در حدود ۱ در ۳۰۰۰-۲۰۰۰ واحد می‌باشد (۴، ۵، ۶) و سپتیسمی باکتریایی بعد از ناسازگاری ABO دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از انتقال فرآورده‌های خونی می‌باشد که دارای رنج مرگ ومیر ۱/۸۵۰۰۰-۱/۲۰۰۰۰ می‌باشد (۶، ۷). بر اساس گزارش FDA[1] (سازمان غذا و دارو) امریکا، از ۱۸۲ مورد مرگ ناشی از انتقال فرآورده‌های خونی بین سال‌های ۱۹۹۱-۱۹۸۶، ۲۹ مورد (۱۶٪) به دلیل آلودگی باکتریایی رخ داده که از این تعداد ۲۱ مورد (۷۲٪) مربوط به تزریق پلاکت بوده است. نتایج فوق بر اساس کشت خون بیماران و کشت باقیمانده پلاکت تزریق شده به دست آمده است (۸). با انجام آزمایش‌های مولکولی، خطر انتقال ویروس نقص ایمنی انسان ۱ در ۲۴۰۰۰۰۰-۱۴۰۰۰۰۰ واحد، خطر انتقال ویروس هپاتیت B، ۱ در ۴۰۰۰۰۰-۲۰۰۰۰۰ واحد و خطر انتقال ویروس هپاتیت C ، ۱ در ۲۰۰۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰۰ واحد

1. Food and Drug Administration

خون تزریقی می‌باشد (۹، ۱۰)، در حالی که عفونت باکتریایی منتقله از راه تزریق فرآورده‌های خونی همچنان عارضه‌ای پایدار در انتقال خون می‌باشد (۶).

علت شیوع آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها نگهداری آن‌ها در دمای اتاق (۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. پلاکت‌ها بر خلاف گلبول‌های قرمز دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) را تحمل نکرده و در صورت نگهداری در دمای کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد به علت تجمع گلیکوپروتئین سطحی (GP Ib-IX)، بعد از انتقال به گیرنده به سرعت توسط ماکروفاژهای کبدی پاکسازی[1] می‌شوند (۱۱).

باکتری‌ها در دمای اتاق به سرعت رشد کرده و از غلظت بسیار پایین (کمتر از ۱۰ CFU/ml) آلودگی در حین جمع‌آوری خون به غلظت بسیار بالا (بیشتر از ۱×۱۰^{۸} CFU/ml) در طی نگهداری در دمای اتاق می‌رسند (۶). از سوی دیگر ماندگاری و بقای پلاکت‌ها بستگی به حضور میزان کافی اکسیژن دارد و این فرآورده باید در کیسه‌هایی نگهداری شود که امکان تبادل هوا، برای تامین گاز اکسیژن در آن‌ها وجود داشته باشد. به همین علت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی که قادر به رشد و تکثیر در شرایط هوازی هستند مهمترین عوامل آلودگی می‌باشند. ارگانیسم‌های همزیست پوست مثل استافیلوکوک اپیدرمیدیس عمدتاً در آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها مشارکت دارد که در دمای ۶-۲ درجه سانتی‌گراد رشد نمی‌کند ولی در دمای اتاق به راحتی تکثیر می‌یابد. بروز آلودگی باکتریایی با مدت زمان نگهداری پلاکت‌ها در دمای اتاق رابطه مستقیم دارد و خطر افزایش تعداد باکتری‌ها در طی نگهداری در دمای اتاق افزایش می‌یابد (۱).

در اواخر سال ۱۹۹۰، استراتژی‌های مختلفی جهت کاهش آلودگی باکتریایی در نظر گرفته شد که شامل ضدعفونی‌کردن پوست، جدا کردن چند میلی لیتر اولیه خون اهدا کننده و تشخیص آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های خونی بود.

1. Clearance

روش مناسب تشخیص آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های خونی از جمله پلاکت باید ساده و به اندازه کافی حساس و اختصاصی باشد تا از تزریق پلاکت آلوده به گیرنده و نیز از نتایج مثبت کاذب که منجر به حذف غیرضروری فرآورده‌های سالم می‌شود، جلوگیری کند. از طرفی باید مقرون به صرفه هم باشد، در حال حاضر چنین روش مناسبی وجود نداشته و همه روش‌های موجود محاسن و معایبی دارند. روش‌های حساس تشخیص آلودگی باکتریایی مثل فلوسیتومتری، PCR[1] و روش‌های کشت اتوماتیک مثل BacT/ALERT وجود دارند اما یا به زمان طولانی نیاز دارند و یا هزینه بر هستند (۱۲)، مثلا روش استخراج DNA و مراحل انجام PCR ، حداقل به یک روز زمان نیاز داشته و علاوه بر آن به دستگاه ترموسیکلر نیز نیاز دارد (۲، ۱۲). از سوی دیگر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت تضمین وجود محصول استریل، راه حل مناسبی به نظر نمی‌آید. ترس از وجود باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و عارض شدن آنافیلاکسی دارویی از علل عدم استقبال از این روش می‌باشد. در این راستا استفاده از یک پروتئین طبیعی پلاسما که خاصیت مهارکنندگی رشد باکتری‌ها را داشته باشد، راه حل مناسبی به نظر می‌رسد.

در این مطالعه ما با استفاده از یک پروتئین طبیعی پلاسما به نام لیپوکالین-۲ که به صورت نوترکیب تهیه شده است امکان پایین آوردن آلودگی باکتریایی و همچنین بالا بردن زمان نگهداری فرآورده‌های پلاکتی را در دمای اتاق بررسی کرده‌ایم. لیپوکالن-۲[2] (NGAL) یک پروتئین مربوط به ایمنی ذاتی است که به طور طبیعی در گرانول نوتروفیل‌ها و در پلاسما و سایر مایعات بدن انسان مثل بزاق وجود دارد. این پروتئین باعث محرومیت باکتری‌ها از آهن محیط می‌شود (۱۳). همه باکتری‌ها برای رشد و تکثیر نیاز ضروری به آهن دارند و لیپوکالین-۲ با توجه به نقش ممانعت‌کنندگی جذب آهن توسط باکتری‌ها، باعث مهار رشد باکتری‌ها در کیسه‌های پلاکتی به دنبال

1. Polymerase Chain Reaction
1. Neutrophil Gelatinase-Associated lipocalin

نگهداری در دمای اتاق (۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد) می‌شود. بدن انسان هم به طور طبیعی در هنگام عفونت، از طریق افزایش تولید پروتئین‌های شلاته کننده آهن، مقدار آهن آزاد را کاهش می‌دهد تا رشد باکتری‌ها را کاهش دهد از جمله این پروتئین‌ها، لاکتوفرین، لیپوکالین-۲ و ... می‌باشد. لیپوکالین-۲، یک گلیکوپروتئین ۲۵ کیلو دالتونی بوده و جزء پروتئین‌های فاز حاد می‌باشد که بیان آن در سلول‌های اپیتلیال تحت شرایط التهاب و عفونت افزایش می‌یابد (۱۳).

لیپوکالین-۲ یک پروتئین باکتریواستاتیک می‌باشد و لیگاند آن، مولکول‌های سیدروفورفریک (سیدروفور متصل به آهن سه ظرفیتی) باکتری‌ها می‌باشد (۱۴). سیدروفورها شلاتورهای قوی برای آهن می‌باشند که توسط باکتری‌ها در شرایط کمبود آهن محیط برای افزایش جذب آهن ترشح می‌شوند. اتصال سیدروفورها به لیپوکالین-۲، باکتری‌ها را از آهن محروم کرده و در نتیجه باعث مهار رشد باکتری‌ها در طی نگهداری در دمای اتاق می‌شود. در این مطالعه اثر مهاری لیپوکالین-۲ روی باکتری‌های شایع آلوده کننده فرآورده‌های پلاکتی بررسی می‌شود. همچنین در سال‌های اخیر اثر آنتی آپوپتوزی لیپوکالین-۲ در سلول‌ها و محافظت در برابر استرس‌های اکسیداتیو و شوک حرارتی نیز ثابت شده است. در این مطالعه علاوه بر بررسی اثر آنتی باکتریایی، اثر آنتی‌آپوپتوزی لیپوکالین-۲ نیز در پلاکت‌ها بررسی می‌شود.

۳- بازنگری منابع و اطلاعات موجود

۳-۱- تاریخچه موضوع

آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی به ویژه واحدهای پلاکتی یک مشکل قدیمی و پایدار در انتقال خون جهان می‌باشد. در طی ۶۰ سال اخیر مطالعات متعددی در ارتباط با شیوع و اهمیت آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی انجام شده است. در اوایل سال ۱۹۳۹، Novak یک مقاله در ارتباط با خطر آلودگی باکتریایی منتشر کرد که در این مقاله ذکر شده بود که به احتمال زیاد ۵٪ از خون‌هایی که به مدت ۱۰ روز در ۶-۴ درجه سانتیگراد ذخیره می‌شوند، آلوده هستند و پیشنهاد کرد که برای کاهش این خطر از آنتی‌بیوتیک‌ها در کیسه‌های خون استفاده شود (۱۵). اولین گزارش ناشی از انتقال فرآورده خونی آلوده به باکتری مربوط به ۴ گیرنده‌ای بود که بعد از دریافت پلاسمای پولد شده، تب شدید نشان دادند و در کشت باقیمانده کیسه، باسیل‌های گرم مثبت جدا شد (۱۶). در بررسی‌های بعدی مشخص شد که احتمال آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های پلاکتی به علت نگهداری در دمای اتاق بیشتر از سایر فرآورده‌هایی می‌باشد که در دمای یخچال یا دمای پایین‌تر نگهداری می‌شوند. در سال ۱۹۹۹ میزان شیوع آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها در امریکا حدود ۱ در هزار واحد تخمین زده شد که با مرگ و میر ۱۵۰ نفر در سال همراه بود به همین جهت اقداماتی در جهت محدود کردن و تشخیص واحدهای آلوده انجام شد (۱۷).

۳-۲- پلاکت

پلاکت‌ها سلول‌های بدون هسته با قطر ۴-۲ میکرون و حجم ۷-۵ فمتولیتر هستند که از مگاکاریوسیت‌های مغز استخوان منشا می‌گیرند. میانگین غلظت پلاکت‌ها در افراد عادی برابر با

۲۷۵×۱۰^{۹} در لیتر خون می‌باشد و در هر زمان حدود ۲/۳ پلاکت‌ها در گردش خون و حدود ۱/۳ آن‌ها در طحال قرار دارند. پلاکت‌ها به مدت ۱۱-۹ روز در خون گردش می‌کنند (۱۸).

۳-۲-۱- ساختار پلاکت‌ها

سطح خارجی پلاکت (گلیکوکالیکس) غنی از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد. یک نوار زیر غشایی از میکروتوبول‌ها (که از پروتئین توبولین تشکیل شده است) حمایت ساختاری از شکل صفحه‌ای و طبیعی پلاکت‌ها را تامین می‌کند. میکروفلامان‌های انقباضی هم مشاهده می‌شود که به طور عمده از اکتین و میوزین تشکیل شده‌اند، یک سسیتم کانالیکولار باز در داخل پلاکت‌ها وجود دارد که ارتباط مستقیم با محیط خارج سلولی دارد. سسیتم توبولی متراکم اغلب در مجاورت سسیتم کانالیکولار باز وجود دارد که از رتیکولوم اندوپلاسمی صاف مشتق شده است و به عنوان محل متابولسیم اسید آراشیدونیک و پمپ منزوی کننده کلسیم عمل می‌کند. انکلوزیون‌های متعدد در داخل پلاکت ممکن است دیده شود، ممکن است هم میتوکندری وهم گلیکوژن مشاهده شود، انواع گرانول‌ها هم در داخل پلاکت دیده می‌شود (۱۸).

۳-۲-۲- فعالیت پلاکت‌ها در هموستاز و انعقاد

در طی فعال شدن سیستم انعقاد ترومبین تولید می‌شود و به عنوان تحریکی بسیار قوی برای فعال‌سازی پلاکت‌ها عمل می‌کند پلاکت‌ها بعد از تحریک شدن توسط ترومبین، کلاژن و سایر عوامل از حالت صفحه‌ای به حالت کروی تغییر شکل داده و پاهای کاذب توسعه می‌دهند و تحت تاثیر انقباض درونی قرار می‌گیرند که این پدیده منجر به مرکزی شدن گرانول‌های آلفا و گرانول‌های با هسته متراکم و سرانجام ترشح محتویات این گرانول‌ها از سلول می‌شود. در نتیجه‌ی فعال‌سازی پلاکت‌ها، تغییرات ساختاری در کمپلکس گلیکوپروتئین‌های IIb/IIIa رخ می‌دهد و منجر به

شکل‌گیری گیرنده‌هایی می‌شود که توانایی اتصال بـه چنـدین پـروتئین پلاسـمایی و از همـه مهمتـر فیبرینوژن را پیدا می‌کنند. متعاقب آسیب عروقی، پلاکت‌های خونی به سرعت به ناحیه زیر انـدوتلیوم نمایان شده، متصل می‌شوند. تحت شرایط برشی کمتر، ماننـد شـرایطی کـه مشخصـه گـردش خـون وریدی هستند، پلاکت‌ها ممکن است به طور مستقیم توسط GPVI و GPIa/IIa به کلاژن در معـرض قرار گرفته متصل شوند. تحت شرایط برشی بیشتر موجود در گردش خون شریانی، چسبندگی توسط اتصال فون ویلبراند در گردش به کلاژن زیر اندوتلیالی در معرض قـرار گرفتـه آغـاز مـی‌شـود و فـون ویلبراند متصل شده به سطح، سپس از طریق کمـپلکس گیرنـده GPIb/IX/V بـه پلاکـت‌هـا متصـل می‌شود. همچنین برای تشکیل میخ پلاکتی پایدار، باید GPIIb/IIIa دچـار تغییـر سـاختاری شـود تـا بتواند به فیبرینوژن به طور کارآمد متصل شود. فیبرینوژن به عنوان یک لیگاند چسبنده اصـلی بـرای GPIIb/IIIa عمل می‌کند و جزء اساسی و مبنای انبوهش پلاکتی است. در نتیجه فعال شـدن پلاکـت علاوه بر تغییر ساختار GPIIb/IIIa، یک جابجایی چشمگیر سلکتین-p از جایگاه ذخیره داخل سـلولی گرانول آلفا به سطح خارجی غشای پلاکت به وجود می‌آید. تحت شرایط فعال‌سازی پلاکت کـه در آن پارتیکل‌های ریز از غشـای پلاکـت بـه بیـرون جوانـه مـی‌زننـد، نیـز سـلکتین-p در غشـای خـارجی پارتیکل‌های ریز عرضه می‌شود. پلاکت‌ها در انعقاد هم نقـش مهمـی بـازی مـی‌کننـد، پـروتئین‌هـای انعقادی و کلسیم در گرانول‌های پلاکتـی ذخیـره مـی‌شـوند و فاکتورهـای انعقـادی بـر روی سـطوح فسفولیپیدی پلاکت‌های فعال شده جمع می‌شوند (۱۸).

۳-۲-۳- انواع کنسانتره‌های پلاکتی

۳-۲-۳-۱- کنسانتره پلاکتی حاصل از آفرزیس (Single Donor Platelets)

از یک اهدا کننده منفرد در طی مراحل ۳-۱ ساعته سیتافرزیس به دست می‌آید و حاوی حداقل ۳×۱۰^{۱۱} پلاکت است. این تعداد معادل ۶-۵ واحد پلاکت تهیه شده از خون کامل راندوم است و حجم پلاسما در این محصول بین ۴۰۰-۲۰۰ میلی لیتر است (۱۹).

آزمایش‌های سازگاری مشابه با پلاکت تهیه شده از خون کامل راندوم می‌باشد. ترجیحاً پلاسمای اهداکننده باید از نظر سیستم ABO، سازگار با گلبول قرمز فرد گیرنده باشد. پلاکت‌های تهیه شده به روش آفرزیس که آزمایش سازگاری از نظر HLA با فرد گیرنده، بر روی آن‌ها انجام می‌گیرد، برای بیمارانی مصرف می‌شود که به علت آلوایمونیزاسیون نسبت به HLA به تزریق پلاکت اهدا کننده راندوم پاسخ نمی‌دهند. پلاکت‌های حاصل از آفرزیس که از نظر سیستم HLA آزمایش نشده باشند، به منظور محدود کردن مواجهه با اهداکنندگان مختلف، برای بیمارانی که مقاوم نیستند مصرف می‌شود (۱۸).

۳-۲-۳-۲- کنسانتره پلاکتی تهیه شده از خون کامل (Random Donor Platelets)

در هر واحد حاوی حداقل $۵/۵ \times ۱۰^{۱۰}$ پلاکت بوده و با دو روش مجزا تهیه می‌شود روش پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)[1] که در ایالات متحده استفاده می‌شود و روش بافی کوت (BC)[2] که در اروپا ترجیح داده می‌شود. در روش PRP ابتدا خون کامل با دور کم سانتریفوژ شده و سپس PRP به دست آمده با سرعت بالاتری چرخانده می‌شود تا پلاکت‌ها رسوب کنند. نشان داده شده که استفاده از سانتریفوژ دور بالا در ابتدا برای وارد کردن پلاکت‌ها به لایه بافی کوت در روی گلبول های قرمز در روش BC و سپس استفاده از دور پایین برای جدا کردن پلاکت‌ها از بافی کوت خارج شده، باعث تولید محصول پلاکتی با میزان کمتری از فعال شدن پلاکت به صورت in vitro می‌شود (۲۰).

1. Platelet-Rich Plasma
2. Buffy Coat

۳-۳- آلودگی باکتریایی فرآورده‌های پلاکتی

۳-۳-۱- آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها به عنوان خطر انتقال خون

هر چند که آلودگی باکتریایی خون، مشکل مشخص و مستند در انتقال خون به مدت بیش از ۶۰ سال بوده است، با کاهش خطر انتقال ویروس‌ها از طریق انتقال خون، آلودگی باکتریایی تبدیل به اصلی‌ترین خطر در میان عفونت‌های منتقل شونده از طریق فرآورده‌های خونی شده است. آلودگی باکتریایی، هر چند که با همه فرآورده‌های خونی همراهی دارد اما دغدغه اصلی در مورد پلاکت‌ها می‌باشد. این امر به آن دلیل است که برخلاف سایر اجزای خون که به صورت یخ زده یا در یخچال نگهداری می‌شوند (که رشد باکتری‌ها را مهار می‌کند)، پلاکت‌ها به مدت حداکثر ۵ روز در دمای اتاق (۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری می‌شوند. در صورتی که کنسانتره پلاکتی آلوده شود، باکتری‌ها می‌توانند در کیسه گرم و غنی از مواد مغذی پلاکت به سرعت رشد کنند و به این دلیل که پلاکت‌ها به طور معمول به بیمارانی تجویز می‌شوند که مستعد سپسیس هستند (بیمارانی که اختلال خونی و انکولوژیک دارند)، این امر شایع است که علایم جدید عفونت به اختلال زمینه ای نسبت داده شود نه به تجویز پلاکت. اگرچه میزان دقیق شیوع آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی نامشخص است اما مطالعات مختلف بر پایه استفاده از روش‌های کشت حساس برآورد کرده‌اند که در حدود ۱ در هر ۳۰۰۰-۲۰۰۰ واحد پلاکتی، آلوده به باکتری می‌باشد (۴، ۶). در سال‌های ۱۹۹۱-۱۹۸۶ در مجموع ۱۸۲ مرگ ناشی از تزریق فرآورده‌های خونی به FDA آمریکا گزارش شد که از این میان علت ۲۹ مرگ، آلودگی باکتریایی محصولات خونی بوده است، حدود ۲۱ مورد (۷۲٪) از این مرگ و میرها با تزریق پلاکت‌های آلوده به باکتری مرتبط بوده است. ۵ مورد مرگ و میر هم در سال‌های ۱۹۹۱-۱۹۹۰ گزارش شد (۸). اگرچه این تردید در سطح گسترده وجود دارد که سمیت باکتریایی پلاکت اغلب تشخیص داده نشده و به این ترتیب میزان شیوع آن کمتر از مقدار واقعی گزارش داده می‌شود.