مسعود سیفی هیر: کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز بهداشت شهرستان اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
سجاد حضی زاده: کارشناس علوم آزمایشگاهی، بیمارستان ولایت شهرستان مغان(گرمی)، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
اسماعیل نوری زاده: کاردان علوم آزمایشگاهی، بیمارستان حضرت ولیعصر مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
خلیل خندان: کارشناس علوم آزمایشگاهی، شبکه بهداشت و درمان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

گذری بر آزمایش های وابسته به فعالیت پلاکت ها

پلاکت های خون بر پایش یکپارچگی اندوتلیوم عروق نظارت دارند. در هنگام آسیب این لایه و به محض برخورد با پروتئین های لایه زیر اندوتلیال تحریک شده و درگذر فرآیندهایی، سرانجام مایه ی ایجاد لخته و توقف خونریزی می شوند. مکانیسم ایجاد لخته بدین سان است: پلاکت ها در هنگام پایین بودن فشار جریان خون وریدی از راه گلیکو پروتئین VIو اینتگرین α2β1 به کلاژن پیوند می شوند و در فشار بالا مانند سرخرگ ها VWF به کلاژن می چسبد و از راه GPIb–IX به پلاکت در اندوتلیال زیرین متصل می شوند. در عروق کوچک تر و مویرگ ها این پیوستن با گلیکوپروتئینIbα برقرار می شود. سلسله رویدادهای سیگنالینگ درون سلولی ایجاد شده، منجر به دگرگونی در شکل پلاکت از حالت دیسکوئید به کروی، گسترده شدن پاهای کاذب وآزاد سازی درونمایه ی گرانول ها می شود. ترشح محتویات ذخیره گرانول ها مانند ADP و سروتونین از گرانول های متراکم، فیبرینوژن و فاکتور رشد از α گرانول ها، باعث تشکیل ترومبوکسان A۲و ترومبوکسان سنتاز از اسید آراشیدونیک از راه مسیر سیکلواکسیژنار-۱ می شود و فسفاتیدیل سرین در روی پلاکت قرار گرفته و تولید ترومبین را تسریع می کند.ADP,TxA۲ و ترومبین باعث آغاز مسیر سیگنالینگ می شوند که در فشارهای کم اینتگرین α2bβ3- را به ترکیبی تبدیل می کند، که میل ترکیبی بیشتری بافیبرینوژن دارد و در فشارهای بیشتر به ترکیبی تبدیل می کند، که تمایل بیشتری به vWf دارد. فیبرینوژن به عنوان لیگاند چسبندگی اصلی برای اینتگرین α2bβ3 عمل می کند و در تجمع پلاکتی نقش اصلی دارد.

روش های بررسی فعالیت پلاکت ها

بررسی فعالیت پلاکت ها، کاری پیچیده، دشوار و زمانبری به شمار می آید و به شکل های مختلفی انجام پذیر است. روشی گام به گام برای تست فعالیت پلاکت ها مورد نیازاست. ارزیابی بالینی باید نخستین گام در این راستا باشد. با استفاده از یک الگوریتم تشخیصی می توان راهکار پژوهشی را برای پزشکان و آزمایشگاه ها بازگو کرد. در بررسی نمونه ها، تست های اولیه شامل شمارش پلاکت ها، بررسی اسمیر خون،LTA با یک پانل استاندارد از آگونیست ها و سنجش ترشحات می باشد. تست های تخصصی تر می تواند برای بیمارانی استفاده شود که ناهنجاری هایی در فعالیت پلاکت آنها مشاهده شده است. تست های تخصصی می تواند شامل LTA با پانل گسترده، بررسی میکروسکوپی، فلوسایتومتری و یا تست های ژنتیکی باشد.

الگوریتم ارزیابی فعالیت پلاکت ها

۱- شمارش پلاکت و اسمیر خون

نخستین گام در بررسی آزمایشگاهی فعالیت پلاکت ها، شمارش سلول های خونی به صورت اتوماتیک و تجزیه و تحلیل اسمیر خون محیطی با تمرکز بیشتر روی تعداد پلاکت هااست. ارائه تعداد دقیق پلاکت ها در یک طیف گسترده با استفاده از روش های خودکار امپدانس الکتریکی وشمارش چشمی پلاکت وقتی که تعداد پلاکت ها کمتر از۵۰×۱۰۹ در لیتر باشد. بررسی ها با جود پلاکت های غول آسا دقت کمتری دارد، در چنین شرایطی بهره گیری از روش های شمارش ایمونولوژیکی مثال فلوسایتومتری دقیق تر خواهد بود.

MPV یا میانگین حجم پلاکتی یکی از پارامترهای اندازه گیری پلاکت است، که با دستگاه های خودکار به دست می آید و به شدت تحت تاثیر نمونه گیری و آنالیزخون است. با این که این دستگاه ها استاندارد هستند ولی هنوز هم به دست آوردن یکMPV دقیق برای نمونه هایی با ترومبوسیتوپنی می تواند مشکل ساز باشد. بررسی اسمیر رنگ آمیزی شده با رایت یا گیمسا، می تواناطلاعات بیشتری در مورد تعداد، اندازه، تجمع پلاکتی،گرانوالریتی و همچنین مورفولوژی اریتروسیت ها وگرانولوسیت ها فراهم کند. ترومبوسیتوپنی کاذب ناشی از تجمع پلاکت

در خون دارای EDTA را می توان با تکرار نمونه گیری با ضد انعقادسیتراته شناسایی و تایید کرد. در ترومبوسیتوپنی فعالیت پلاکت ها تحت تاثیر قرار نمی گیرد. در برخی از ناهنجاری های ارثی پلاکت، هم تعداد پلاکت ها کاهش یافته و هم فعالیت آن ها غیر طبیعی است.

۲- آزمون فعالیت هموستاتیک و بیماری فون ویلبراند VWD

امروزه هیچ آزمون آزمایشگاهی ایده آل، ارزان وحساس تشخیصی برای شناسایی بیماران مبتلا به نقص فعالیتی پلاکت وجود ندارد، روش مورد استفاده در اکثرآزمایشگاه ها تستBT ودر موارد کمتر PFA یا آنالیزفعالیت پلاکتی است، گرچه دارای کارایی در تشخیص هموستاز اولیه هستند، باید توجه داشت که این روش ها فاقدحساسیت و اختصاصیت کافی برای بیماران با خونریزی مخاطی و اختلالات پلاکتی هستند، بنابراین از ارزش کمی برخوردار می باشند. جهت تشخیصVWD تست فعالیت پلاکت توصیه می شود،VWD در بیمارانی که ترومبوسایتوپنی دارند به عنوان نوع ۲B در نظر گرفته می شود.

۳-بررسی فعالیت پلاکت با روش (Light Transmission Aggregometry)LTA

روشی که به طور گسترده برای بررسی فعالیت پلاکت مورد استفاده قرار می گیرد LTA است. زمانی که پلاسمای سیتراته غنی از پلاکت به طور مداوم در اگریگومتر پلاکتی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مخلوط می شود، LTA تغییردرعبور نور را در پاسخ به اضافه شدن محرک های شیمیایی به واسطه نور سنجی پایش می کند. علاوه برآگونیست های پلاکت، تغییر شکل از حالت دیسکوئید به کروی منجر به کاهش اولیه در عبور نور می شود و به دنبال آن تشکیل تجمعات پلاکتی وابسته به فیبرینوژن باعث عبوربیشتر نور می شود. در این باره حداکثر افزایش در عبور نور(در صد تجمع پلاکتی) اندازه گیری می شود.

موج ثانویه تجمع پلاکتی در غلظت بالایADP و اپی نفرین ناشی ازتولید و ترشح TxA۲ از گرانول هامشاهده می شود.آگلوتیناسیون پلاکتهای تحریک شده توسط ریستوستین نیز با استفاده از LTA قابل اندازه گیری است. ریستوستین باعث اتصال VWF به GPIbα می شود.

متغیرهای قبل از اندازه گیری به روش LTA

- LTA به گونه ی چشمگیری وابسته به شیوه ی نمونه گیری است، در نتیجه استاندارد سازی متغیرهای مربوطه می تواند دربهبود نتایج اثرگذار باشند، شرایط ایده آل نمونه گیری شامل مواردی از قبیل: عدم مصرف سیگار یا کافئین، استراحت کوتاه مدت بیماران، عدم مصرف دارو ۱ تا ۲ هفته قبل ازنمونه گیری و ...است.
- به طور کلی مصرف داروهای موثر بر فعالیت پلاکت باید ۷ تا ۱۰ روز قبل از آزمایش متوقف شود ولی در مواردی که قطع مصرف دارو میسر نباشد، سابقه مصرف دارو به نتیجه بیمار ضمیمه می گردد تا به تفسیر نتیجه آزمایش کمک نماید.
- رژیم غذایی درنتایج حاصله تاثیر گذار است.
- خونگیری از رگ سالم با حداقل فشار تورنیکه انجام گیرد و خون در لوله حاوی ضد انعقاد سیتراته به منظور حفظpH پایدار ریخته شود، چند میلی لیتر از خون باید دور ریخته شود و یا صرف سایر آزمایش ها گردد. نمونه باید فاقدهمولیز بوده یا لیپمیک نباشد، چرا که هر دو بر شدت نورعبوری تاثیر دارند.
- اندازه گیری میزان پلاکتPRP یا پلاسمای غنی از پلاکت دارا ی اهمیت است که با سانتریفیوژ کردن خون کامل با دور ۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تهیه می شود.
- نمونه های با تعداد زیر ۱۵۰×۱۰۹ در لیتر باید با دقت بیشتری بررسی شود.
- نمونه PRP باید به مدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق قرار گیرد و حداکثر فاصله بین نمونه گیری و انجام آزمایش ٤ ساعت است.

متغیرهای حین اندازه گیری با روشLTA

- آزمایشگاه های بالینی باید یک روش عملیاتی استانداردجهتLTA ارایه دهند که شامل انتخاب پانل استانداردآگونیست ها و غلظت آن ها باشد و برای هر یک محدوده مرجع تعریف نمایند تا در استفاده از هر محلول با Lot Number متفاوت نتایج قابل قبولی ارایه دهد.
- استفاده از نمونه کنترل الزامی است.
- مخلوط کردن محلول ها با نمونه های مورد آزمایش بیش از ۳ تا ۵ دقیقه بیشتر طول نکشد.

- لیست کاملی از آگونیست ها برای تشخیص اولیه بیماری ضروری نیست بلکه با پانل عمومی نیز می توان نتایج آنرمال را شناسایی کرد.
- وقتی نتایج حاصل از پانل عمومی غیر طبیعی باشند، پانل کامل تری مورد نیاز است که به عنوان تاییدیه از آن استفاده شود.
- در صورتی که نتایج حاصل از غلظت های پایین غیرطبیعی باشند، بررسی در غلظت های بالا نیز لازم است، برای نمونه در رابطه با ریستوسین بررسی غلظت ۱/۲ و ۰/۵ باعث افزایش ارزش تست و دقت بیشتر خواهد شد.
- در برخی پنل های گسترده تر مواردی از قبیلTRAPs ها، پپتید مرتبط با کلاژن یا کانوولکسین، calciumionophore A۲۳۱۸۷ نیز مطرح شده اند ک اطلاعات جامع تری را نیز شامل می شوند، آگلوتیناسیون باید از لحاظ تغییر شکل، طول فاز تاخیر، شیب منحنی تجمع، حداکثر درصد آگلوتیناسیون و عدم آن بررسی شود.

٤- WBA (Whole Blood Aggregometry)

این روش تجمع با تغییر در امپدانس الکتریکی بین دوالکترود در مواجهه با پلاکت های متصل به هم و در حضورآگونیست را اندازه گیری می کند. پلاکت های تجمع یافته با افزایش امپدانس یک منحنی ایجاد می کنند. از جمله برتری های این روش نسبت به روش قبلی می توان به مواردی همانند نیاز به حجم کمتری از خون، دستکاری کمترنمونه ها و اتوماتیک بودن با الکترودهای یکبار مصرف اشاره کرد .ولی در شرایط کنونی گزینش نخست آزمایشگاه های بالینی نیست.

۵- سنجش آزادسازی ATP

اندازه گیری نوکلئوتید آزاد شده از گرانول های متراکم پلاکت به عنوان مطالعات کمکی استفاده می شود که در آن کاهش ATP نشانگر وجود اختلالاتی در تعداد، محتویات و یا ترشح گرانول های پلاکتی است. اندازه گیری ترشحات گرانولی پلاکت ها در کنارLTA باعث افزایش واکنش های تجمع نورعبوری برای تعدادی از اختلالات باعث افزایش حساسیت و کیفیت تست می گردد و به نوعی تاییدگر آن است، روش معمول لومی اگریگومتری است که در حضور آتناگونیست های محرک آزاد سازی ATP از گرانول های متراکم سنجیده می شود، برای رسیدن به نتایج استاندارد در این روش نرمال سازی نمونه ها دارای اهمیت است درغیر این صورت نتایج به دست آمده از مراکز مختلف قابل ارزیابی و مقایسه با هم نخواهند بود.

بررسی تعداد گرانول های پلاکت ها توسط میکروسکوپ الکترونیکی نشان می دهد، که آزاد سازیATP ثانویه همزمان با کاهش تعداد گرانول های متراکم کاهش می یابد.

روش های آلترناتیو برای سنجش نوکلئوتید کل و آزاد شده لومینومتری یا HPLC است. همچنین بررسی جذب یا ترشح سروتونین نشاندار شده با مواد رادیو اکتیو نیزمی تواند مورد استفاده قرار گیرد.

٦- فلوسیتومتری

در بیماران خاصی مثل سندرم برنارد سولیر یا ترومباستنی گلانزمن که فقدان یا نقصی در گلیکوپروتئین ها وجود دارد، فلوسایتومتری نه تنها برای اندازه گیری بیان رسپتورهای گلیکوپروتئینی اصلی موجود در سطح پلاکت سودمنداست، بلکه برای ارزیابی توانایی GP IIb/IIIa جهت انجام تغییرات ساختاری نیز مفید خواهد بود. فلوسایتومتری همچنین می تواند برای شناسایی ناهنجاری های رسپتورهای کلاژن و ترومبین نیز مفید باشد.

۷- ژنوتایپینگ

تست های مولکولی می تواند در تشخیص نارسایی های ارثی پلاکتی کمک کننده باشد، ژن ها گزینه ی تازه ای هستند، که در تشخیص پیش از تولد و مواردی که مطالعه فنوتیپی مقدور نباشند، مورد استفاده قرار می گیرند. در پژوهش های تازه دستاوردهای جامع تری از ناهنجاری های مذکوربه دست آمده است.

منابع:

1. Israels S.J: Laboratory testing for platelet function disorders. International of Laboratiry Hematolgy :34,2015.
2. Lambert MP. What to do when you suspect an inherited platelet disorder. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 83–377 :2011;2011.
3. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. Int J Lab Hematol 4 .91–29:77;2007. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. Br J Haematol 78–165:165;2014.
5. Cattaneo M. Are the bleeding time and PFA100- useful in the initial screening of patients with mucocutaneous bleedings of hereditary nature? J Thromb Haemost 1–2:890;2004.
6. Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, Morales M, Aranda E, Panes O, Pereira J, Mezzano D. Template bleeding time and PFA100- have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. J Thromb Haemost 8–2:892;2004.
7. Jackson SC, Sinclair GD, Cloutier S, Duan Z, Rand ML, Poon MC. The Montreal platelet syndrome kindred has type 2B von Willebrand disease with the VWF V1316M mutation. Blood 51–113:3348;2009.