

## تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر به‌عنوان شاخص فعالیت پلاکتی در فرآورده‌های پلاکتی تغلیظ شده از پلاسمای غنی از پلاکت: گزارش کوتاه

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۹ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۹/۳۰

**زمینه و هدف:** نگهداری پلاکت‌ها همراه با آسیب ذخیره‌ای پلاکت و افزایش فعالیت این سلول‌ها است. هدف این مطالعه بررسی ارتباط مقادیر افزایش یافته سلکتین P به‌عنوان شاخص فعالیت پلاکتی و تولید مولکول‌های اکسیژن واکنشگر (ROS) بود. **روش بررسی:** در این مطالعه شش کیسه کنسانتره پلاکتی به‌مدت پنج روز نگهداری شدند و در روزهای صفر تا پنج پس از نگهداری سطوح بیان سلکتین P و میزان تولید داخل سلولی ROS با روش فلوسایتومتری سنجیده شد. **یافته‌ها:** میزان بیان ROS در روز صفر  $9 \pm 4$  درصد بود که به‌تدریج با افزایشی معنادار به سطح  $63 \pm 39/4$  در روز پنجم نگهداری رسید ( $P=0/002$ ). این افزایش ارتباط معناداری با مقادیر افزایش یافته بیان سلکتین P داشت ( $P=0/001$ ,  $r=0/72$ ). **نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش مقادیر ROS در حین ذخیره‌سازی فرآورده پلاکتی و ارتباط مستقیم آن با افزایش فعالیت پلاکت‌ها، به‌نظر می‌رسد تولید ROS بتواند به‌عنوان یکی از شاخص‌های فعالیت پلاکتی در ارزیابی کیفی فرآورده‌های گفته‌شده مورد توجه قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** فعالیت پلاکتی، پلاسمای غنی از پلاکت، گونه‌های اکسیژن واکنشگر، سلکتین P.

امین شهباز قصبه

مهران قاسم‌زاده

احترام السادات حسینی\*

مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شیخ فضل‌الله نوری، تقاطع بزرگراه شهید همت، جنب برج میلاد، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون. تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۰۱۵۷۲-۳. E-mail: e.hossini10@yahoo.com.au

### مقدمه

PSL با افزایش گلیکولیز و کاهش PH و در نتیجه آن سازماندهی دوباره اسکلت سلولی و تغییر شکل، کاهش توانایی آگریگاسیون، ترشح گرانول‌های پلاکتی، افزایش ROS یا گونه‌های اکسیژن واکنشگر (Reactive oxygen species)، تغییر در غشای لیپیدی، تغییرات عملکردی که نشانه‌ای از آپوپتوز است مانند کاهش پتانسیل غشایی میتوکندری و افزایش فسفاتیدیل سرین غشای خارجی در ارتباط است.<sup>۱،۵</sup> سرعت پیشرفت و گسترش PSL متأثر از روش جمع‌آوری پلاکت، دستکاری‌های پس از جمع‌آوری و شرایط ذخیره‌سازی آن می‌باشد.<sup>۶</sup>

مشخص شده است که در طول ذخیره‌سازی پلاکت‌ها، میزان بیان رسپتور سلکتین P و مولکول CD40L افزایش می‌یابد.<sup>۸</sup> از مارکرهای دیگر فعال‌شدن پلاکت بیان GPIIb/IIIa فعال و حضور میکروپارتیکل‌ها در فرآورده ذخیره شده است.<sup>۹</sup> ذخیره پلاکت‌ها به‌مدت طولانی و به‌ویژه عدم آزیتیشن آن باعث تجمع اکسیژن دی‌اکسیدکربن و کاهش

تزریق فرآورده پلاکتی به‌عنوان یک روش درمانی برای جلوگیری از خونریزی در بیماران ترمبوسیتوپنی و افرادی که دچار کاهش تولید پلاکت در مغز استخوان هستند، بسیار دارای اهمیت است. هرچند داخل بدن انسان طول عمر طبیعی پلاکت هشت تا ۱۰ روز است ولی ماندگاری پلاکت‌های جمع‌آوری‌شده در بانک خون حداکثر حدود پنج روز می‌باشد که یکی از دلایل آن افزایش ریسک رشد باکتری در طول ذخیره‌سازی پلاکت‌ها در دمای اتاق است.<sup>۱</sup> عامل دیگری که بروی زمان ذخیره‌سازی پلاکت موثر است مجموعه‌ای از تغییرات مخربی است که باعث ایجاد خسارات گسترده در عملکرد و ساختار پلاکت می‌شود که به آن PSL یا آسیب نگهداری پلاکت (Platelet storage lesion) می‌گویند.<sup>۳</sup> البته برخی از این تغییرات پس از تزریق به بیمار به‌حالت طبیعی باز می‌گردند و برگشت‌پذیر می‌باشند.<sup>۴</sup> در بسیاری از مطالعات

ROS با منشای گلبول‌های سفید گردد.<sup>۱۷</sup> هدف از پژوهش کنونی بررسی تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر به‌عنوان شاخص فعالیت پلاکتی در فرآورده‌های پلاکتی تغلیظ‌شده از پلاسما غنی از پلاکت می‌باشد.

## روش بررسی

مطالعه انجام‌شده از نوع تجربی بوده و جامعه مورد مطالعه، کنسانتره‌های پلاکتی حاصل از PRP بود که از پایگاه مرکزی انتقال خون استان تهران تهیه و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات منتقل شد. این مطالعه از نیمه دوم سال ۱۳۹۴ تا اوایل سال ۱۳۹۵ به انجام رسید. نمونه‌گیری در جمعیت نرمال و به‌صورت تصادفی انجام شد. شش کیسه، پلاکت‌های کنسانتره رندوم از نظر میزان بیان سلکتین P و تولید ROS در روزهای صفر، اول، سوم و پنجم مورد مطالعه قرار گرفتند. کیسه‌ها به محض دریافت تا زمان آزمایش در آریتاتور پلاکتی انکوباتودار و در دمای °C ۲۵ نگهداری گردیدند.

نمونه‌برداری هر بار از ناحیه کورد، در شرایط استریل و زیر هود کلاس II انجام گردید. نمونه‌های پلاکتی بر اساس دستورکاری که از پیش گفته شده تهیه گردید.<sup>۱۹</sup> نمونه‌ها با آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ کنترل (FITC Mouse IgG1 Isotype control) و یا PerCP Mouse IgG1 Isotype control (Miltenyi Biotec, Germany) و یا آنتی‌بادی ضد P-selectin کوژنوگه با PerCP و ضد GPIIb/IIIa کوژنوگه با FITC (از e-bioscience, America) و به‌مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای °C ۳۷ انکوبه گردیده و پس از طی زمان انکوباسیون پلاکت‌ها با پارافرمالدید ۲٪ فیکس گردید. مطالعات متعددی از Dihydrorhodamine (DHR) 123 جهت اندازه‌گیری مقادیر ROS داخل سلولی استفاده نموده‌اند.<sup>۱۷، ۲۰</sup> جهت اندازه‌گیری ROS سوسپانسیون پلاکتی با DHR 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) در غلظت نهایی ۱ μM به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای °C ۳۷ انکوبه گردیده و سپس با پارافرمالدید ۲٪ فیکس شد. در نهایت تمامی نمونه‌ها توسط دستگاه Sysmex CyFlow® flow cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) و توسط FlowJo software, version 7 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA) مورد خوانش و آنالیز قرار گرفتند.<sup>۱۹</sup>

برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) استفاده گردید. برای

میزان پتانسیل غشایی میتوکندری و pH می‌گردد و در نهایت با افزایش تولید آنیون، سوپراکسید پلاکت‌ها فعال و به PSL ختم می‌شود.<sup>۱۰</sup> همچنین تحریک پلاکت‌ها با آگونیست‌های مختلف مانند ترومبین در نهایت می‌تواند باعث افزایش ROS و فعال شدن پلاکت‌ها شود.<sup>۱۱</sup>

ترکیبات اکسیدکننده فعال مولکول‌های شیمیایی ناپایداری هستند که به‌سرعت با مولکول‌های دیگر از جمله لیپوپروتئین با دانسیته پایین، نیتريت پروکسی و ترکیبات پروتئین برای ایجاد فرم اکسید وارد واکنش می‌شوند. در غلظت فیزیولوژیک، ROS به‌عنوان پیامبر ثانویه و همچنین به‌عنوان سیگنال داخل سلولی جهت فعال کردن سلول عمل می‌کند.<sup>۱۲</sup> در میان سلول‌هایی که ROS در آن‌ها به‌عنوان پیامبر ثانویه نقش دارد پلاکت یک نمونه بارز است که در آن گونه‌های اکسیژن واکنشگر در فعال کردن سلول درگیر می‌شود.<sup>۱۳</sup>

این واقعیت که ROS در فعال شدن پلاکت‌ها نقش دارد با به‌کار بردن آنتی‌اکسیدان در شرایط آزمایشگاهی خارج از بدن به‌طور غیرمستقیم ثابت می‌شود. مطالعات نشان داد ویتامین E (آنتی‌اکسیدان) ظرفیت مداخله با فعالیت پلاکت را دارد. مصرف روزانه ویتامین E دفع اداری ۱۱-دی‌هیدرو-ترومبوکسان B<sub>2</sub> را که مارکر فعال شدن پلاکت در *in vivo* است به‌طور معناداری کاهش می‌دهد.<sup>۱۴</sup> در طول تحریک پلاکت توسط یک آگونیست، ترکیبات مختلفی از ROS مانند آنیون سوپراکسید (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) یا پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) در پلاکت‌ها تولید می‌شوند که به‌نوبه خود باعث فعال شدن و در نتیجه انتشار آگریگیشن پلاکت می‌شود.<sup>۱۳</sup>

با تولید آنیون سوپراکسید این مولکول توسط آنزیم سوپراکسیددیس‌موتاز به مولکول پرواکسید (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) که پایدارتر است تبدیل می‌شود.<sup>۱۵</sup> در واقع آگریگیشن پلاکتی وابسته به کلاژن با انفجار (افزایش) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> مرتبط است که پلاکت‌ها را از طریق به حرکت در آوردن کلسیم، فعال می‌کند. تاثیر تحرک کلسیم القا شده توسط H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> شامل تولید آراشیدونیک اسید آزاد شده از غشای سلولی و ترومبوکسان A<sub>2</sub> و تنظیم افزایشی فسفولیپاز C می‌باشد که در نهایت موجب فعال شدن پلاکت‌ها می‌شوند.<sup>۱۶</sup>

به‌ویژه اینکه به‌دنبال نگهداری فرآورده‌ها و فعال شدن ناخواسته آن‌ها به‌واسطه فرایند PSL، فعال شدن پلاکت‌ها و آزاد شده محتویات گرانولی آن‌ها مانند مولکول‌های پیش‌التهابی به‌ویژه سلکتین P، به‌نوبه خود می‌تواند منجر به افزایش فعالیت لکوسیت‌ها موجود و در نتیجه تولید

در بررسی ROS همان‌طوری که در نمودار ۱-ج دیده می‌شود، میزان بیان DHR 123 در روز صفر برابر با بیان (4±9.9٪)، به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean±SD) بود که این مقادیر در روزهای اول، سوم و پنجم به‌تدریج افزایش داشت به‌گونه‌ای که از روز سوم مقادیر ROS به‌صورت معناداری نسبت به روز صفر بیشتر بود (P=0/049) و این افزایش در روز پنجم به‌صورت چشمگیری از روز صفر بیشتر بود (P=0/002). این نمودار حاکی از افزایش تدریجی تولید ROS در فرآورده پلاکتی همچنین همراه با افزایش مقادیر بیان سلکتین P پلاکت‌ها بود که سطوح آن از روز صفر تا روز پنجم به‌شکل معناداری افزایش یافت (P=0/003). در ضمن همان‌طوری که در نمودار ۱-د نشان داده شده است، این مطالعه حاکی از ارتباط مستقیم بین مقادیر افزایشنده ROS و میزان بیان سلکتین P به‌عنوان شاخص فعالیت پلاکتی بوده است (r=0/77, P=0/001).

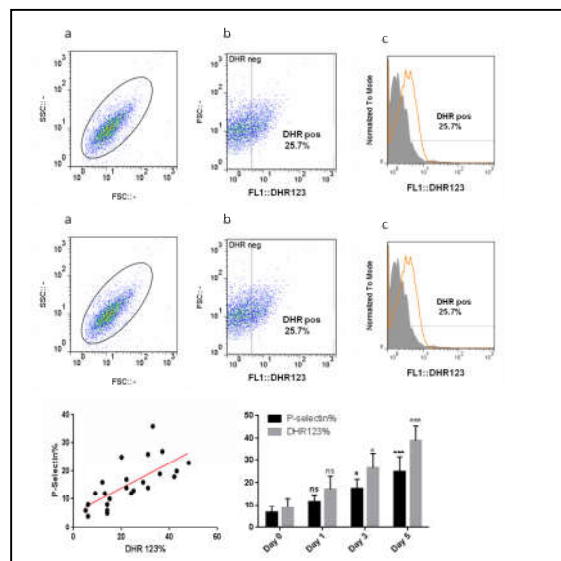
## بحث

Manasa و همکارانش با استفاده از پلاکت‌های جدا شده از Rat نشان داده‌اند که نگهداری پلاکت‌ها به‌مدت بیش از شش روز در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند موجب افزایش چشمگیری در میزان تولید ROS و اگرگاسیون پلاکتی گردد.<sup>۳۲</sup> با این وجود باید در نظر داشت که تجربه این پژوهش‌گران با توجه به شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده نمی‌تواند قابل تعمیم به فرآورده‌های پلاکتی تولیدی جهت مصارف بالینی باشد. مطالعه دیگری که بر روی پلاکت‌ها به‌دست آمده از داوطلبان انسانی انجام شده است گویای شروع افزایش مقادیر ROS از روز اول ذخیره پلاکتی نسبت به روز صفر می‌باشد به‌گونه‌ای که در روزهای سوم و پنجم مقادیر به‌شکل معناداری افزایش می‌یابد.<sup>۳۳</sup> هرچند در مطالعه یاد شده پلاکت‌ها با روشی مشابه سازمان‌های انتقال خون جداسازی و در کیسه نگهداری شدند ولیکن شرایط تولید آن‌ها بر اساس استانداردهای مورد پذیرش در طب انتقال خون نبوده است. با این وجود نتایج آن قابل مقایسه با پژوهش کنونی می‌باشد که از افزایش معنادار مقادیر تولید ROS از روز سوم نگهداری فرآورده‌های پلاکتی حکایت دارد. فارغ از اندازه‌گیری ROS در طول نگهداری پلاکت، بررسی مقادیر بیان سلکتین P و یا اندازه‌گیری سطح محلول آن به‌عنوان یکی از شاخص‌های معتبر در

مقادیر خام هر گروه میانگین و انحراف معیار محاسبه شد و برای مشخص کردن منشأ تفاوت احتمالی بین سه نمونه (روزهای صفر، یک، سه و پنج) از روش آماری آنالیز Kruskal-Wallis همراه با آزمایش مقایسه‌ای چندگانه Dunn استفاده شد. در این مطالعه حصول مقادیر  $P < 0/05$  به‌عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد. جهت مطالعه ارتباط بین مقادیر ROS و بیان سلکتین P از روش آماری ضریب همبستگی پیرسون همراه با رگرسیون خطی استفاده شد.

## یافته‌ها

در نمودار ۱-الف و ۱-ب نمونه‌ای از اسکترگرام (a and b) و نمودار بافتی (c) مربوط به اندازه‌گیری میزان بیان DHR و بیان سلکتین P را در فرآورده پلاکتی روز سوم نشان داده است.



نمودار ۱: الف- مقادیر بیان DHR123 (تولید ROS) در فرآورده‌های پلاکتی نگهداری‌شده روز سوم. منحنی خاکستری میزان پایه در سلول فاقد DHR123 می‌باشد. ب- مقادیر بیان P-selectin در فرآورده‌های پلاکتی نگهداری‌شده روز سوم. منحنی خاکستری میزان پایه در نمونه کنترل ایزوتیپ بود. ج- مقادیر بیان رسپتور P-selectin و DHR123 (تولید ROS) در فرآورده‌های پلاکتی نگهداری‌شده. د- ارتباط بیان P-selectin و DHR123 (تولید ROS) در فرآورده‌های پلاکتی در طی پنج روز نگهداری (r=0/77, P=0/001). ns معنادار نبود، \* (P<0/05)، \*\*\* (P<0/005).

اکسیژن باشند همچنین می‌توانند به صورت غیرمستقیم نشان از نقش ROS فعال‌سازی پلاکت‌ها باشد.<sup>۳۰،۲۹</sup> با وجود مشاهده این ارتباطات مستقیم اینکه آیا فعالیت پلاکتی ابتدا منجر به تولید ROS می‌شود و یا اینکه تولید ROS باعث ایجاد و یا تشدید فعالیت پلاکتی می‌شود، موضوعی است که کماکان مورد توجه و سوال می‌باشد.

پژوهش کنونی نشان‌دهنده روند افزایش‌یابنده مقادیر ROS در حین ذخیره‌سازی فرآورده پلاکتی و ارتباط مستقیم آن با افزایش فعالیت پلاکت‌ها بوده است. بنابراین با توجه به ارتباط گفته‌شده، تولید ROS حین ذخیره‌سازی پلاکت‌ها می‌تواند به‌عنوان یکی از شاخص‌های فعالیت پلاکتی در ارزیابی کیفی فرآورده‌های گفته‌شده مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی دکتر مهران قاسم‌زاده مصوب موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون به کد ۱۷۸۱-۳۳-۰۱-۱۳۹۳ می‌باشد که به‌عنوان پایان‌نامه آقای امین شهباز قصبه دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد خون‌شناسی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون مورد تصویب قرار گرفته است. مولفین از حمایت موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و سازمان انتقال خون ایران و همچنین همکاری پایگاه انتقال خون استان تهران به‌ویژه سرکار خانم فاطمه عباسی قدردانی می‌نمایند.

ارزیابی میزان فعالیت پلاکتی<sup>۲۵،۲۴</sup> همزمان با مطالعه ROS می‌تواند داده‌های مهمی را در خصوص ارتباط تولید محصولات فعال اکسیژن با فعال شدن ناخواسته پلاکت‌ها در حین نگهداری فراهم نماید.

مطالعات گوناگونی حاکی از افزایش بیان شاخص‌های عملکردی پلاکتی در حین نگهداری فرآورده‌ها می‌باشد.<sup>۸،۷</sup> در مطالعه ما نیز روند افزایش میزان بیان رسپتور سلکتین P در طول نگهداری فرآورده پلاکتی مورد تایید قرار گرفته است که همچنین این افزایش علاوه بر همراهی با افزایش مقادیر ROS در فرآورده‌های پلاکتی، ارتباط معنادار مستقیمی را نیز با تولید محصولات آزاد اکسیژن در حین نگهداری نشان می‌دهد. مشاهده ما مبنی وجود ارتباط تولید ROS با فعال شدن پلاکتی همچنین در راستا با برخی از مطالعات علوم پایه می‌باشد که مولکول‌های ROS را به‌عنوان عوامل سیگنالی فعال‌کننده سلول‌ها مطرح می‌نمایند.<sup>۱۲</sup> یکی از این مطالعات، مشاهدات Krötz و همکارانش است که نشان می‌دهد تولید آنیون سوپراکسید وابسته به NADPH اکسیداز در پلاکت‌ها باعث تحریک اگریگیشن و تولید ترومبوز وابسته به پلاکت می‌شود.<sup>۲۶</sup> از طرفی سایر مطالعات گویای آن است که مجاور نمودن پلاکت‌ها با داروهای آنتی‌اکسیدان می‌تواند باعث کاهش میزان بیان مارکرهای فعالیت پلاکتی مانند سلکتین P و ایتنرین  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  فعال گردد.<sup>۲۸،۲۷</sup> به‌علاوه نقص عملکرد پلاکتی در بیماری‌های مادرزادی که همراه با اختلال تولید رادیکال‌های فعال

## References

- Dumont LJ, Kleinman S, Murphy JR, Lippincott R, Schuyler R, Houghton J, et al. Screening of single-donor apheresis platelets for bacterial contamination: the PASSPORT study results. *Transfusion* 2010;50(3):589-99.
- Nassaji F, Ghasemzadeh M, Jamaat ZP, Hosseini E. The expression levels of platelet adhesive receptors in PRP derived platelet concentrates during storage. *Tehran Univ Med J* 2016;74(1):16-24.
- Pirmohammad Jamaat Z, Hosseini E, Ghasemzadeh M. The expression loss of GPIIb/IIIa due to ectodomain shedding in PRP derived platelet concentrates during storage. *Tehran Univ Med J* 2016;74(2):92-8.
- Schubert P, Devine DV. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. *Blood Transfus* 2010;8(Suppl 3):s69-s72.
- Cardigan R, Williamson LM. The quality of platelets after storage for 7 days. *Transfus Med* 2003;13(4):173-87.
- Leaver HA, Schou AC, Rizzo MT, Prowse CV. Calcium-sensitive mitochondrial membrane potential in human platelets and intrinsic signals of cell death. *Platelets* 2006;17(6):368-77.
- Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. *Transfusion* 2008;48(7):1469-77.
- Hosseini E, Ghasemzadeh M1,2, Nassaji F1, Jamaat ZP1. GPVI modulation during platelet activation and storage: its expression levels and ectodomain shedding compared to markers of platelet storage lesion. *Platelets* 2016:1-11.
- Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2006;580(22):5313-20.
- 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(2):390-9.
- Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczyński A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002;13(3):175-82.
- Sugamura K, Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2011;51(5):978-92.
- Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res* 2012;129(3):378-81.

14. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f<sub>2</sub>alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99(2):224-9.
15. Cardoso AR, Chausse B, da Cunha FM, Luévano-Martínez LA, Marazzi TB, Pessoa PS, et al. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free Radic Biol Med* 2012;52(11-12):2201-8.
16. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998;91(2):484-90.
17. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost* 2015;113(6):1224-35.
18. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* 2013;131(3):191-7.
19. Ghasemzadeh M, Kaplan ZS, Alwis I, Schoenwaelder SM, Ashworth KJ, Westein E, et al. The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. *Blood* 2013;121(22):4555-66.
20. Rothe G, Emmendorffler A, Oser A, Roesler J, Valet G. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrohodamine 123. *J Immunol Methods* 1991;138(1):133-5.
21. Yee J, Giannias B, Kapadia B, Chartrand L, Christou NV. Exudative neutrophils. Modulation of microbicidal function in the inflammatory microenvironment. *Arch Surg* 1994;129(1):99-105.
22. Manasa K, Vani R. Influence of oxidative stress on stored platelets. *Adv Hematol* 2016;2016:4091461.
23. Perales Villarroel JP, Figueredo R, Guan Y, Tomaiuolo M, Karamercan MA, Welsh J, et al. Increased platelet storage time is associated with mitochondrial dysfunction and impaired platelet function. *J Surg Res* 2013;184(1):422-9.
24. Mehrpoori M, Hosseini E, Amini Kafi-Abad S. The effect of prestorage leukoreduction on the levels of expression and shedding of the pro-inflammatory molecule P-Sel in random PRP platelets. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2015;12(2):153-62.
25. Sharifrazi M, Ghasemzadeh M, Saraf Kazerooni E, Hosseini E. The effect of pre-storage leukoreduction on the levels of expression of the pro-inflammatory molecule CD40 ligand in random PRP platelets. *Razi J Med Sci* 2016;22(141):38-46.
26. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(11):1988-96.
27. Bakdash N, Williams MS. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radic Biol Med* 2008;45(2):158-66.
28. Pignatelli P, Carnevale R, Pastori D, Cangemi R, Napoleone L, Bartimoccia S, et al. Immediate antioxidant and antiplatelet effect of atorvastatin via inhibition of Nox2. *Circulation* 2012;126(1):92-103.
29. Violi F, Sanguigni V, Camevale R, Plebani A, Rossi P, Finocchi A, et al. Hereditary deficiency of gp91(phox) is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study. *Circulation* 2009;120(16):1616-22.
30. Pignatelli P, Carnevale R, Di Santo S, Bartimoccia S, Sanguigni V, Lenti L, et al. Inherited human gp91phox deficiency is associated with impaired isoprostane formation and platelet dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(2):423-34.

## Reactive oxygen species generation as marker of platelet activation in PRP derived platelet concentrates during storage: *brief report*

Amin Shahbaz Ghasabeh M.Sc.  
Mehran Ghasemzadeh Ph.D.  
Ehteramolsadat Hosseini Ph.D.\*

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

\* Corresponding author: Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Organization Building, Hemmat Express Way, Next to the Milad Tower, Tehran, Iran.  
Tel: +98 21 88601572-3  
E-mail: e.hosseini10@yahoo.com.au

### Abstract

Received: 30 Jul. 2016 Revised: 17 Dec. 2016 Accepted: 19 Dec. 2016 Available online: 20 Dec. 2016

**Background:** Platelet storage is complicated by deleterious changes that cause progressive structural and functional damages, so-called platelet storage lesion (PSL). PSL is commonly manifested by augmented platelet activation which is also associated with the increased levels of reactive oxygen species (ROS). Whether ROS generation increases during the storage of platelet concentrates and whether it will be correlated with P-selectin expression as a valid marker of platelet activation was investigated in this study.

**Methods:** In our experimental study, six PRP-platelet concentrates were randomly obtained from Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO). All the platelet products met the standard quality assessment based on AABB guidelines. Washed platelets were subjected to flow cytometry analysis for the evaluation of P-selectin expression and intracellular ROS production using DHR 123 in day 0, 1, 3 and 5 after storage. Statistical data were analyzed by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test. For correlations, linear regression analysis was applied. P values of less than 0.05 were considered to be significant.

**Results:** Platelets ROS generation significantly increased from day 0 to day 5 of storage ( $P=0.0002$ ). This observed gradual increase was also directly correlated with the increasing levels of P-selectin expression during platelet storage ( $r=0.72$ ,  $P=0.0001$ ).

**Conclusion:** Our study showed significant increases in ROS generation during the storage of platelet concentrates correlated with the increments of P-selectin expression as an important marker of platelet activation. This finding suggests that the analysis of ROS generation can also be considered a marker of platelet activation during storage. However, whether ROS generation first induces platelet activation or platelet activation during storage triggers ROS generation is still remain to be determined.

**Keywords:** p-selectin, platelet activation, platelet-rich plasma, reactive oxygen species.