

بررسی آزمایشگاهی اختلالات عملکردی پلاکت

• محمد جواهریان

کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، شبکه بهداشت و درمان شهرستان بیله سوار

mohammad.lab.1388@gmail.com



چکیده

خونی و سایر تست های انعقادی اشاره نمود، در موارد پیشرفته که نیاز به مطالعه دقیق تری دارند انجام آزمایش های تجمع پلاکتی، سنجش ترشحات مرتبط با انعقاد و بررسی فاکتور فون ویلبراند (VWF) مفیدتر خواهد بود، همچنین در صورت نیاز می توان از روش های پیشرفته تری مانند فلوسایتومتری، بررسی میکروسکوپی و تست های مولکولی بهره جست. ضمناً در جهت بهبود و ارتقای کیفی

بررسی عملکرد پلاکت کار پیچیده و دشواری محسوب می شود، مطالعات گام به گام در مورد ارزیابی بیماران مشکوک به اختلالات پلاکتی با بهره گیری از روش های آزمایشگاهی مناسب جهت تشخیص علت خونریزی مورد استفاده قرار می گیرد، از جمله این آزمایش ها می توان به شمارش تعداد پلاکت، بررسی ریخت شناسی سلول های

نتایج، توصیه‌ها و دستورالعمل‌های مفیدی ارائه گردیده است. در این مقاله به بررسی روش‌های موجود و کاربردی آزمایشگاه‌ها می‌پردازیم.

واژه‌های کلیدی: اختلالات پلاکتی، بررسی عملکرد پلاکت، تجمع پلاکتی، ترومبوسیتوپنیا، تکنیک‌های آزمایشگاه بالینی استاندارد

مقدمه

بررسی عملکرد پلاکت‌ها امری دشوار و زمان‌بر می‌باشد و به شکل‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند پس ایجاد یک الگوریتم معتبر و مرجع برای آزمایشگاه‌ها به یک چالش مبدل می‌شود هر چند که تا به حال روشی مناسب جهت استاندارد سازی تست‌های پلاکتی منتشر نگردیده است که با بهره‌گیری از آن بتوان کیفیت را ارتقاء بخشید، از سال ۲۰۰۸ بعضی موسسات دست به چنین برنامه‌ای زدند که همین ایده‌ها و دستورالعمل‌های ابتدایی در ادامه مورد توجه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی قرار گرفتند و حاصل مطالعات بیشتر موجب تحول در روش‌های مورد استفاده مثل نحوه خونگیری و آماده‌سازی نمونه و حتی تغییر در اندیکس‌ها و پارامترهای آزمایش‌ها و در نتیجه تفسیر همین نتایج گردید، هدف اصلی این بررسی معرفی فاکتورهای اساسی در مطالعات پلاکتی می‌باشد.

هموستاز اولیه

پلاکت‌های داخل‌گردش خون بر حفظ یکپارچگی اندوتلیوم عروق نظارت دارند و در صورت آسیب این لایه و به محض برخوردشان با پروتئین‌های لایه تحت اندوتلیال تحریک شده و طی فرآیندهایی در نهایت موجب ایجاد لخته و توقف خونریزی می‌شوند. پلاکت‌ها در شرایطی که فشار جریان خون وریدی کم باشد از طریق گلیکو پروتئین VI و اینتگرین $\alpha 2\beta 1$ به کلاژن متصل می‌شوند و در فشار بالا مانند سرخرگ‌ها VWF به کلاژن متصل می‌شود و این vWf از طریق GPIb-IX به پلاکت در ساب‌اندوتلیال متصل می‌شوند. در عروق کوچک تر و مویرگ‌ها این اتصال به وسیله گلیکوپروتئین Iba برقرار می‌شود. سلسله حوادث سیگنالینگ داخل

سلولی ایجاد شده منجر به تغییراتی در شکل پلاکت از حالت دیسکوئید به کروی، گسترده شدن پاهای کاذب و آزاد سازی محتویات گرانول‌ها می‌شود. ترشح محتویات ذخیره گرانول‌ها (مانند ADP و سروتونین از گرانول‌های متراکم، فیبرینوژن و فاکتور رشد از α گرانول‌ها) باعث تشکیل ترومبوکسان A_2 و ترومبوکسان سنتاز از اسید آراشیدونیک از طریق مسیر سیکلواکسیژناز-۱ می‌شود و فسفاتیدیل سرین در سطح پلاکت فرار گرفته و تولید ترومبین را تسریع می‌کند.

ADP, TxA_2 و ترومبین باعث آغاز مسیر سیگنالینگ می‌شوند که در فشارهای کم اینتگرین $\alpha 2\beta 3$ را به ترکیبی تبدیل می‌کند که میل ترکیبی بیشتری با فیبرینوژن دارد و در فشارهای بیشتر به ترکیبی تبدیل می‌کند که تمایل بیشتری به vWf دارد. فیبرینوژن به عنوان لیگاند چسبندگی اصلی برای اینتگرین $\alpha 2\beta 3$ عمل می‌کند و در تجمع پلاکتی نقش اصلی دارد.

ارزیابی بالینی

ارزیابی بیماران با بررسی جزئیاتی از قبیل سابقه خونریزی، توارث و مشاهدات بالینی آغاز می‌شود که می‌تواند حاصل استفاده از ابزارهای تشخیص خونریزی (BATs) باشد و همچنین می‌تواند در استانداردسازی اطلاعات به دست آمده از سوابق بیمار و ثبت دقیق دفعات و شدت خونریزی کمک کننده باشد.

جواب منفی برخی از BATs‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است و می‌تواند در آینده به عنوان یک صفحه نمایشگر قبل از انجام تست‌های آزمایشگاهی باشد، با این حال ابزار موجود اختصاصیت کمی دارد و تشخیص قطعی ارائه نمی‌کند.

خونریزی مخاطی می‌تواند نتیجه کمبود یا نقص ارثی در تعداد یا عملکرد پلاکت یا vWd باشد در صورت عدم وجود سابقه خانوادگی خاص همه این احتمالات را باید در نظر گرفت زیرا تنها با مشاهده خونریزی بین آن‌ها نمی‌توان تمایز قائل شد.

یک رویکرد الگوریتمی می‌تواند در سازماندهی بررسی بالینی و آزمایشگاهی این بیماران مفید باشد و چندین

آزمونی جهانی عملکرد هموستاتیک و بیماری فون ویلبراند VWD

در حال حاضر هیچ آزمون آزمایشگاهی ایده آل، ارزان و حساس تشخیصی برای شناسایی بیماران مبتلا به نقص عملکردی پلاکت وجود ندارد، روش مورد استفاده در اکثر آزمایشگاه‌ها تست BT و در موارد کمتر PFA یا آنالیز عملکرد پلاکتی می باشد، علی رغم استفاده در تشخیص هموستاز اولیه باید توجه داشت که این روش‌ها فاقد حساسیت و اختصاصیت کافی برای بیماران با خونریزی مخاطی و اختلالات پلاکتی می باشند، بنابراین ارزش تست‌های فوق کاهش می‌یابد.

جهت تشخیص VWD تست عملکرد پلاکت توصیه می شود، VWD در بیمارانی که ترومبوسیتوپنی دارند به عنوان نوع 2B در نظر گرفته می شود وقتی که همراه با ماکروترومبوسیتوپنی در بافت‌ها باشد VWD نوع پلاکتی در نظر گرفته می شود.

بررسی عملکرد پلاکت

LTA (Light Transmission Aggregometry)

روش‌هایی که به طور گسترده برای بررسی عملکرد پلاکت مورد استفاده قرار می‌گیرد LTA است. زمانی که پلاسما سیترات غنی از پلاکت به طور مداوم در آگریگومتر پلاکتی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد مخلوط می‌شود، LTA تغییر در عبور نور را در پاسخ به اضافه شدن محرک‌های شیمیایی به واسطه نورسنجی پایش می‌کند. علاوه بر آگونیست‌های پلاکت، تغییر شکل از حالت دیسکوئید به کروی منجر به کاهش اولیه در عبور نور می‌شود و به دنبال آن تشکیل تجمعات پلاکتی وابسته به فیبرینوژن باعث عبور بیشتر نور می‌شود. معمولاً حداکثر افزایش در عبور نور (% تجمع) اندازه‌گیری می‌شود.

موج ثانویه تجمع پلاکتی در غلظت بالای ADP و اپی‌نفرین ناشی از تولید و ترشح TxA2 از گرانول‌ها مشاهده می‌شود.

آگلوتیناسیون پلاکت‌های تحریک شده توسط ریستوستین نیز با استفاده از LTA قابل اندازه‌گیری می‌باشند، ریستوستین باعث اتصال VWF به GPIIb/IIIa می‌شود.

الگوریتم برای تشخیص اختلالات پلاکتی در دسترس می‌باشد.

بهترین حالت پیشنهادی در رابطه با تست‌های پلاکتی استفاده از افراد متخصص و بهره‌گیری از تست‌های با اختصاصیت و تکرارپذیری بالا می‌باشد و باید در نظر داشت که نتایج باید با توجه به اطلاعات بالینی بیمار تفسیر شوند.

بررسی آزمایشگاهی

شمارش پلاکت و اسمیر خون:

اولین قدم در بررسی آزمایشگاهی پلاکت‌ها، شمارش سلول‌های خونی به صورت اتوماتیک و تجزیه و تحلیل اسمیر خون محیطی با تمرکز بیشتر روی تعداد پلاکت‌ها است. ارائه تعداد دقیق پلاکت‌ها در یک طیف گسترده با استفاده از روش‌های خودکار امپدانس الکتریکی و شمارش چشمی پلاکت وقتی که تعداد پلاکت‌ها کمتر از 50×10^9 در لیتر باشد و یا در صورت وجود پلاکت‌های غول‌آسا دقت کمتری دارد، در چنین شرایطی بهره‌گیری از روش‌های شمارش ایمنولوژیکی مثل فلووسایتمتری دقیق‌تر خواهد بود.

MPV یا میانگین حجم پلاکتی یکی از پارامترهای اندازه‌گیری پلاکت است که توسط دستگاه‌های خودکار به دست می‌آید و به شدت تحت تاثیر نمونه‌گیری و آنالیز خون است. با این‌که این دستگاه‌ها استاندارد هستند ولی هنوز هم به دست آوردن یک MPV دقیق برای نمونه‌هایی با ترومبوسیتوپنی می‌تواند مشکل‌ساز باشد.

بررسی اسمیر رنگ آمیزی شده با رایت یا گیمسا می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد تعداد، اندازه، تجمع پلاکتی، گرانولاریتی و همچنین مورفولوژی اریتروسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها فراهم کند.

ترومبوسیتوپنی کاذب ناشی از تجمع پلاکت در خون دارای EDTA را می‌توان با تکرار نمونه‌گیری با ضد انعقاد سیترات شناسایی و تایید کرد. در ترومبوسیتوپنی عملکرد پلاکت‌ها تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. در برخی از اختلالات ارثی پلاکت هم تعداد پلاکت‌ها کاهش یافته و هم عملکرد آن‌ها غیر طبیعی است.



مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تهیه می شود، نمونه باید فاقد همولیز بوده یا لیپمیک نباشد، چرا که هر دو بر شدت نور عبوری تاثیر دارند. اندازه گیری میزان پلاکت PRP دارای اهمیت است.

نمونه های با تعداد زیر $10^9 \times 150$ در لیتر باید با دقت بیشتری بررسی شود.

نمونه PRP باید به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گیرند و حداکثر فاصله بین نمونه گیری و انجام آزمایش ۴ ساعت می باشد.

متغیرهای آنالیتیکال

آزمایشگاه های بالینی باید یک روش عملیاتی استاندارد جهت LTA ارائه دهند که شامل انتخاب پانل استاندارد از آگونیست ها و غلظت آن ها باشد و برای هر یک محدوده مرجع تعریف نمایند تا در استفاده از هر محلول با Number Lot متفاوت نتایج قابل قبولی ارائه دهد، استفاده از نمونه کنترل الزامی می باشد.

باید در نظر داشت 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 نمود، پانل عمومی که در جدول شماره ۱ آمده است شامل برخی از آگونیست ها می باشد.

دستورالعمل های مرتبط با LTA اخیرا انتشار یافته است. اگرچه برخی دستورالعمل های خاص بین آنها متفاوت می باشد اما نقطه مشترک همه آنها معرفی این روش به عنوان بهترین روش آزمایشگاهی می باشد.

متغیرهای پره آنالیتیک

LTA به طور قابل توجهی تحت تاثیر نمونه گیری می باشد، در نتیجه استاندارد سازی متغیرهای مربوطه می تواند در بهبود 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 از نمونه گیری و ...

به طور کلی مصرف داروهای موثر بر عملکرد پلاکت باید ۷ تا ۱۰ روز قبل از آزمایش متوقف شوند 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. به این نکته نیز باید توجه داشت که رژیم غذایی هم در نتایج حاصله تاثیر گذار است.

خونگیری از رگ سالم با حداقل فشار تورنیکه انجام گیرد و در لوله حاوی ضد انعقاد سیترا ته به منظور حفظ pH پایدار ریخته شود، چند میلی لیتر از خون باید دور ریخته شود و یا صرف سایر آزمایش ها گردد. PRP یا پلاسمای غنی از پلاکت با سانتریفیوژ خون کامل با دور 200g به

Agonist	Starting concentration	Concentration range	Target
Basic Panel			
ADP	2–2.5 μM	0.5–20 μM	P2Y ₁ and P2Y ₁₂
Epinephrine	5 μM	0.5–10 μM	Adrenergic receptors
Collagen (type I)	1–2 $\mu\text{g/mL}$	1.0–5.0 $\mu\text{g/mL}$	GPVI and $\alpha 2\beta 1$
Arachidonic Acid	1 mM	0.5–2.0 mM	TxA ₂ synthesis
Ristocetin	1.2 mg/mL	1.0–1.5 mg/mL	VWF/GPIb
	0.5 mg/mL	0.5–0.7 mg/mL	
Extended Panel			
U46619	1 μM	1–5 μM	TxA ₂ receptor
TRAP	10 μM	10–100 μM	PAR-1
CRP	10 ng/mL	10–1000 ng/mL	GPVI
A23187	1 μM	1–10 μM	Calcium mobilization

TxA₂, thromboxane A₂; VWF, von Willebrand factor; TRAP, thrombin receptor activating peptide; CRP, collagen-related peptide; PAR-1, protease-activated receptor-1.
*Adapted with modifications from References [2] and [4].

جدول ۱. پنل آگونیست پیشنهادی برای اگرگومتری عبور نور

calcium TRAPs ها، پپتید مرتبط با کلاژن یا کانولکسین، calcium ionophore A23187 نیز مطرح شده‌اند که طبیعتاً اطلاعات جامع تری را نیز شامل می‌شوند، آگلوتیناسیون باید از لحاظ تغییر شکل، طول فاز تاخیر، شیب منحنی تجمع، حداکثر درصد آگلوتیناسیون و عدم آن بررسی شود، نمونه‌هایی از الگوهای LTA مرتبط با اختلالات پلاکتی انتخاب شده و در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

وقتی نتایج حاصل از پانل عمومی غیر طبیعی باشند پانل کامل تری نیاز است که به عنوان تاییدیه از آن استفاده شود در صورتی که نتایج حاصل از غلظت‌های پایین غیرطبیعی باشند، بررسی در غلظت‌های بالا نیز لازم است، به طور مثال در رابطه با رسیتوسین بررسی غلظت ۱،۲ و ۰،۵ باعث افزایش ارزش تست و دقت بیشتر خواهد شد. در برخی پنل‌های گسترده تر مواردی از قبیل

Disorder	LTA responses	Additional observations or testing
Bernard-Soulier syndrome	Absent agglutination response to ristocetin	Macrothrombocytopenia Rule out VWD Flow cytometry for GPIb quantitation
Type 2B VWD and platelet-type VWD	Increased agglutination with low concentrations of ristocetin	Macrothrombocytopenia and platelet clumping may be present. VWD testing required
Glanzmann thrombasthenia	Absent response to all agonists except ristocetin	Flow cytometry for α IIb β 3 quantitation
Aspirin-like defect	Absent response to arachidonic acid with normal response to U46619; decreased responses to ADP and low concentrations of collagen [second wave]	Medication history for COX-1 inhibitors
Secretion defect and δ -granule defect	May show decreased response to several agonists: ADP, collagen and epinephrine	ATP release and/or electron microscopy for δ -granule evaluation
ADP receptor defect	Decreased or absent response to ADP	Medication history for ADP receptor inhibitors Flow cytometry for P2Y ₁₂ quantitation
Gray platelet syndrome	May show decreased response to thrombin and/or collagen	Macrothrombocytopenia with pale platelets on blood film

LTA, light transmission aggregometry; VWD, von Willebrand disease; COX, cyclooxygenase.

جدول ۲. واکنش‌های تجمع نورعبوری برای تعدادی از اختلالات عملکردی پلاکت

ولی در شرایط کنونی انتخاب اول آزمایشگاه‌های بالینی نیست.

سنجش ترشحات: آزادسازی ATP

اندازه‌گیری نوکلئوتید آزاد شده از گرانول‌های متراکم پلاکت معمولاً به عنوان مطالعات کمکی استفاده می‌شود که در آن کاهش ATP نشانگر وجود اختلالاتی در تعداد محتویات و یا ترشح گرانول‌های پلاکتی است. اندازه‌گیری ترشحات گرانولی پلاکت‌ها در کنار LTA باعث افزایش

(Whole Blood Aggregometry) WBA

اندازه‌گیری تجمع با تغییر در امپدانس الکتریکی بین دو الکترود در مواجهه با پلاکت‌های متصل به هم و در حضور آگونست، روش مورد استفاده می‌باشد. پلاکت‌های تجمع یافته با افزایش امپدانس یک منحنی ایجاد می‌کنند. از جمله برتری‌های این روش نسبت به روش قبلی می‌توان به مواردی مثل نیاز به حجم کمتری از خون، دستکاری کمتر نمونه‌ها و این که روشی کاملاً اتوماتیک با الکترودهای یکبار مصرف است اشاره کرد.

سایر مطالعات

ابزارها و روش‌های گسترده‌ای برای poc (point of care) پلاکت‌ها موجود می‌باشد که تمرکز اصلی این ابزارها نظارت بر درمان‌های ضد پلاکتی در بیماری‌های قلبی عروقی و بعد از جراحی می‌باشد، بسیاری از این ابزارهای تشخیصی یا مناسب نیستند یا فاقد اعتبار کافی می‌باشند. در بین ابزارهای موجود تنها اوپتیمول به طور استثنایی دارای قابلیت بررسی همزمان چند آگونیست مختلف می‌باشد و می‌توان گفت که قابل تطبیق با LTA است.

تضمین کیفیت

اگرچه تست مهارت‌های خارجی (EPT) چندین سالی است که بخشی از برنامه تضمین کیفیت آزمایشگاه‌ها را به خود اختصاص داده است با این حال تست عملکرد پلاکت به دلیل پیچیدگی آماده‌سازی نمونه و حمل و نقل در برنامه‌های EPT چالش‌های منحصر به فردی را ایجاد کرده است. در حال حاضر تعدادی از سازمان‌ها EPT را برای ارزیابی تست‌های انعقادی، LTA، شمارش گرانول‌متراکم و تفسیر بالینی پیشنهاد می‌کنند.

خلاصه

روش گام به گامی برای تست عملکرد پلاکت مورد نیاز است. ارزیابی بالینی باید اولین قدم در تعیین نیاز به تست‌های آزمایشگاهی باشد و با استفاده از یک الگوریتم تشخیصی می‌توان استراتژی تحقیقات را برای پزشکان و آزمایشگاه‌ها توجیه کرد. در اغلب موارد تست‌های اولیه شامل شمارش پلاکت‌ها، بررسی اسمیر خون، LTA با یک پانل استاندارد از آگونیست‌ها و سنجش ترشحات می‌باشد. تست‌های تخصصی‌تر می‌تواند برای بیمارانی استفاده شود که در تحقیقات اولیه آن‌ها (چه بالینی چه آزمایشگاهی) ناهنجاری‌هایی در عملکرد پلاکت مشاهده شده است. تست‌های تخصصی می‌تواند شامل LTA با پانل گسترده، بررسی میکروسکوپی، فلوسایتومتری و یا تست‌های ژنتیکی باشد.

حساسیت و کیفیت تست می‌گردد و به نوعی تاییدگر آن می‌باشد، روش معمول لومی‌اگریگومتری است که در آن آگونیست‌های محرک آزاد سازی ATP از گرانول‌های متراکم سنجیده می‌شود، برای رسیدن به نتایج استاندارد در این روش نرمال سازی نمونه‌ها دارای اهمیت است در غیر این صورت نتایج به دست آمده از مراکز مختلف قابل ارزیابی و مقایسه با هم نخواهند بود.

بررسی تعداد گرانول‌های پلاکت‌ها توسط میکروسکوپ الکترونیکی نشان می‌دهد که آزاد سازی ATP ثانویه همزمان با کاهش تعداد گرانول‌های متراکم کاهش می‌یابد، روش‌های آلترناتیو برای سنجش نوکلئوتید کل و آزاد شده لومینومتری یا HPLC می‌باشد. همچنین بررسی جذب یا ترشح سروتونین نشاندار شده با مواد رادیو اکتیو نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

فلوسایتومتری

در بیماران خاصی مثل سندرم برنارد سولیریا ترومباستنی گلازمن که فقدان یا نقصی در گلیکوپروتئین‌ها وجود دارد فلوسایتومتری نه تنها برای اندازه‌گیری بیان رسپتورهای گلیکوپروتئینی اصلی موجود در سطح پلاکت سودمند است بلکه برای ارزیابی توانایی GP IIb/IIIa جهت انجام تغییرات ساختاری نیز مفید خواهد بود. فلوسایتومتری همچنین می‌تواند برای شناسایی اختلالات رسپتورهای کلاژن و ترومبین نیز مفید باشد.

ژنو تایپینگ

تست‌های مولکولی می‌تواند در تشخیص اختلالات ارثی پلاکتی کمک‌کننده باشد، ژن‌های عامل جدیدی شناسایی شده‌اند که در تشخیص قبل از تولد و مواردی که مطالعه فنوتیپی مقدور نباشند مورد استفاده قرار می‌گیرند. طی مطالعات اخیر بررسی‌های جامع‌تری از اختلالات مذکور صورت گرفته است.

References

1- ISRAELS S. J: Laboratory testing for platelet function disorders. INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY HEMATOLOGY:34:2015.