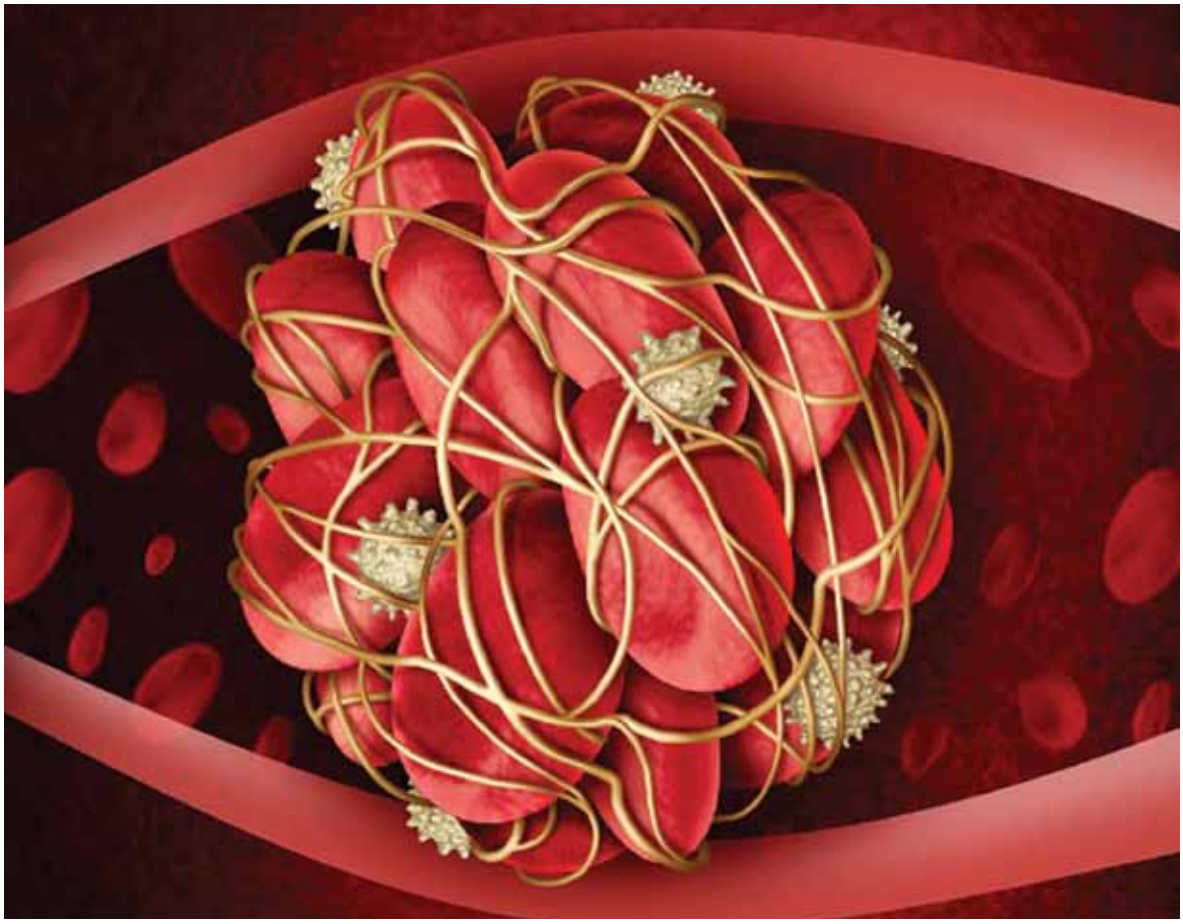
بررسی آزمایشگاهی اختلالات عملکردی پلاکت

• محمد جواهریان
کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، شبکه بهداشت و درمان شهرستان بیله سوار
mohammad.lab.1388@gmail.com



چکیده

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 می‌توان به شمارش تعداد پلاکت، بررسی ریخت شناسی سلول‌های خونی و سایر تست های انعقادی اشاره نمود، در موارد پیشرفته که نیاز به مطالعه دقیق تری دارند انجام آزمایش‌های 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. ضمنا در جهت بهبود و ارتقای کیفی

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

نتایج، توصیه ها و دستورالعمل های مفیدی ارایه گردیده است. در این مقاله به بررسی روش های موجود و کاربردی آزمایشگاه ها می پردازیم.

واژه های کلیدی: اختلالات پلاکتی، بررسی عملکرد پلاکت، تجمع پلاکتی، ترومبوسیتوپنیا، تکنیک های آزمایشگاه بالینی استاندارد

مقدمه

بررسی عملکرد پلاکت ها امری دشوار و زمان بر می باشد و به شکل های مختلفی مورد استفاده قرار می گیرند پس ایجاد یک الگوریتم معتبر و مرجع برای آزمایشگاه ها به یک چالش مبدل می شود هر چند که تا به حال روشی مناسب جهت استاندارد سازی تست های پلاکتی منتشر نگردیده است که با بهره گیری از آن بتوان کیفیت را ارتقاء بخشید، از سال ۲۰۰۸ بعضی موسسات دست به چنین برنامه ای زدند که همین ایده ها و دستوالعمل های ابتدایی در ادامه مورد توجه آزمایشگاه های تحقیقاتی قرار گرفتند و حاصل مطالعات بیشتر موجب تحول در روش های مورد استفاده مثل نحوه خونگیری و آماده سازی نمونه و حتی تغییر در اندیکس‌ها و پارامترهای آزمایش ها و در نتیجه تفسیر همین نتایج گردید، هدف اصلی این بررسی معرفی فاکتورهای اساسی در مطالعات پلاکتی می باشد.

هموستاز اولیه

پلاکت های داخل گردش خون بر حفظ یکپارچگی اندوتلیوم عروق نظارت دارند و در صورت آسیب این لایه و به محض برخوردشان با پروتئین های لایه تحت اندوتلیال تحریک شده و طی فرآیندهایی در نهایت موجب ایجاد لخته و توقف خونریزی می شوند. پلاکت ها در شرایطی که فشار جریان خون وریدی کم باشد از طریق گلیکو پروتئین VI و اینتگرین α2β1 به کلاژن متصل می شوند و در فشار بالا مانند سرخرگ ها VWF به کلاژن متصل می شود و این vWf از طریق GPIb-IX به پلاکت در ساب اندوتلیال متصل می شوند. در عروق کوچک تر و مویرگ ها این اتصال به وسیله گلیکوپروتئین Ibα برقرار می شود. 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 گرانول ها می شود. ترشح محتویات ذخیره گرانول ها (مانند ADP و سروتونین از گرانول‌های متراکم، فیبرینوژن و فاکتور رشد از α گرانول ها) باعث تشکیل ترومبوکسان A_2 و ترومبوکسان سنتاز از اسید آراشیدونیک از طریق مسیر سیکلواکسیژنار-۱ می‌شود و فسفاتیدیل سرین در سطح پلاکت قرار گرفته و تولید ترومبین را تسریع می کند.

ADP, TxA_2 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.

ارزیابی بالینی

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

جواب منفی برخی از BATs ها از اهمیت زیادی برخوردار است و می تواند در آینده به عنوان یک صفحه نمایشگر قبل از انجام تست های آزمایشگاهی باشد، با این حال ابزار موجود اختصاصیت کمی دارد و تشخیص قطعی ارایه نمی کند.

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

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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

الگوریتم برای تشخیص اختلالات پلاکتی در دسترس می‌باشد.
بهترین حالت پیشنهادی در رابطه با تست های پلاکتی استفاده از افراد متخصص و بهره گیری از تست های با اختصاصیت و تکرار پذیری بالا می باشد 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 پلاکت ها، شمارش سلول های خونی به صورت اتوماتیک و تجزیه و تحلیل اسمیر خون محیطی با تمرکز بیشتر روی تعداد پلاکت ها است. ارائه تعداد دقیق پلاکت ها در یک طیف گسترده با استفاده از روش های خودکار امپدانس الکتریکی و شمارش چشمی پلاکت وقتی که تعداد پلاکت ها کمتر از ۵۰×۱۰^{۹} در لیتر باشد و یا در صورت وجود 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 اندازه‌گیری پلاکت است که توسط دستگاه های خودکار به دست می آید و به شدت تحت تاثیر نمونه گیری و آنالیز خون است. با این که این دستگاه ها استاندارد هستند ولی هنوز هم به دست آوردن یک MPV دقیق برای نمونه‌هایی با ترومبوسیتوپنی می تواند مشکل ساز باشد.
بررسی اسمیر رنگ آمیزی شده با رایت یا گیمسا می تواند اطلاعات بیشتری در مورد تعداد، اندازه، تجمع پلاکتی، گرانولاریتی و همچنین مورفولوژی اریتروسیت ها و گرانولوسیت ها فراهم کند.
ترومبوسیتوپنی کاذب ناشی از تجمع پلاکت در خون دارای EDTA را می توان با تکرار نمونه گیری با ضد انعقاد سیتراته شناسایی و تایید کرد. در ترومبوسیتوپنی عملکرد پلاکت ها تحت تاثیر قرار نمی گیرد. در برخی از اختلالات ارثی پلاکت هم تعداد پلاکت ها کاهش یافته و هم عملکرد آن ها غیر طبیعی است.

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 آزمایشگاه ها 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 روش ها 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 ترومبوسایتوپنی دارند به عنوان نوع 2B در نظر گرفته می شود وقتی که همراه با ماکروترومبوسایتوپنی در بافت‌ها باشد VWD نوع پلاکتی در نظر گرفته می شود.

بررسی عملکرد پلاکت

LTA (Light Transmission Aggregometry)

روشی که به طور گسترده برای بررسی عملکرد 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 تغییر در عبور نور را در پاسخ به اضافه شدن محرک های شیمیایی به واسطه نور سنجی پایش می کند. علاوه بر آگونیست 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 عبور بیشتر نور می شود. معمولا حداکثر افزایش در عبور نور (٪ تجمع) اندازه گیری می شود.
موج ثانویه تجمع پلاکتی در غلظت بالای ADP و اپی‌نفرین ناشی ازتولید و ترشح TxA2 از گرانول ها مشاهده می شود.
آگلوتیناسیون پلاکت‌های تحریک شده توسط ریستوستین نیز با استفاده از LTA قابل اندازه گیری می‌باشند، ریستوستین باعث اتصال VWF به GPIbα می‌شود.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

دستورالعمل‌های مرتبط با LTA اخیرا انتشار یافته است. اگرچـه برخی دسـتورالعمل‌های خاص بیـن آنها متفاوت می‌باشـد اما نقطه مشـترک همه آنها معرفـی این روش به عنوان بهترین روش آزمایشگاهی می‌باشد.

متغیرهای پره آنالیتیک

LTA به طور قابل توجهی تحت تاثیر نمونه گیری می‌باشد، در نتیجه اسـتاندارد سـازی متغیرهای مربوطه می‌تواند در بهبود نتایج اثرگذار باشند، شرایط ایده آل نمونه‌گیری شامل مواردی از قبیل: عدم مصرف سـیگار یا کافئین، استراحت کوتاه مدت بیمـاران، 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 شـوند ولی در مواردی که قطع مصرف دارو میسـر نباشد، سابقه مصرف دارو به نتیجه بیمار ضمیمه می گردد تا به تفسیر نتیجه آزمایش کمک نماید.

بـه این نکته نیز باید توجه داشـت که رژیم غذایی هم در نتایج حاصله تاثیر گذار است.

خونگیری از رگ سـالم با حداقل فشار تورنیکه انجام گیرد و در لوله حاوی ضد انعقاد سـیتراته بـه منظور حفظ pH پایدار ریخته شـود، چند میلی لیتر از خون باید دور ریخته شـود و یا صرف سایر آزمایش ها گردد. PRP یا پلاسمای غنی از پلاکت با سـانتریفیوژ خـون کامل با دور 200g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تهیه می شود، نمونه باید فاقد همولیز بوده یا لیپمیک نباشـد، چرا که هر دو بر شدت نور عبوری تاثیر دارند. اندازه گیری میزان پلاکت PRP دارای اهمیت است.

نمونـه های بـا تعداد زیـر ۱۵۰×۱۰^{۹} در لیتر باید با دقت بیشتری بررسی شود.

نمونه PRP باید به مدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق قرار گیرند و حداکثر فاصله بین نمونه گیری و انجام آزمایش ٤ ساعت می باشد.

متغیرهای آنالیتیکال

آزمایشـگاه های بالینی باید یک روش عملیاتی اسـتاندارد جهت LTA ارایه دهند که شـامل انتخاب پانل اسـتاندارد از آگونیسـت هـا و غلظت آن ها باشـد و بـرای هر یک محدوده مرجع تعریف نمایند تا در اسـتفاده از هر محلول بـا Number Lot متفاوت نتایـج قابل قبولی ارایه دهد، استفاده از نمونه کنترل الزامی می باشد.

باید در نظر داشـت مخلوط کردن محلول ها با نمونه های مورد آزمایش بیش از ۳ تا ۵ دقیقه بیشتر طول نکشد.

لیسـت کاملی از آگونیست ها برای تشخیص اولیه بیماری ضروری نیسـت بلکه بـا پانل عمومی نیز مـی توان نتایج آنرمال را شناسایی نمود، پانل عمومی که در جدول شماره۱ آمده است شامل برخی از آگونیست ها می باشد.

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 μg/mL	1.0–5.0 μg/mL	GPVI and α2β1
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 A_2; 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

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 غلظت های پایین غیرطبیعی باشند، بررسی در غلظت های 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 پنل های گسترده تر مواردی از قبیل TRAPsها، پپتید مرتبط با کلاژن یا کانوولکسین، calcium ionophore A23187 نیز مطرح شده‌اند که طبیعتا 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، نمونه هایی از الگوهای LTA مرتبط با اختلالات پلاکتی انتخاب شده و در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

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 αIIbβ3 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. واکنش های تجمع نورعبوری برای تعدادی از اختلالات عملکردی پلاکت

(Whole Blood Aggregometry) WBA

اندازه گیری تجمع با تغییر در امپدانس الکتریکی بین دو الکترود در مواجهه با پلاکت های متصل به هم و در حضور آگونیست، روش مورد استفاده می باشد. 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 مثل نیاز به حجم کمتری از خون، دستکاری کمتر نمونه ها و این که روشی کاملا اتوماتیک با الکترودهای یکبار مصرف است اشاره کرد.

ولی در شرایط کنونی انتخاب اول آزمایشگاه های بالینی نیست.

سنجش ترشحات: آزادسازی ATP

اندازه گیری نوکلئوتید آزاد شده از گرانول های متراکم پلاکت معمولا 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 کنار LTA باعث افزایش

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

حساسیت و کیفیت تست می گردد و به نوعی تاییدگر آن می باشد، روش معمول لومی اگریگومتری است که در آن آگونیست 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 در غیر 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 می‌یابد، روش های آلترناتیو برای سنجش نوکلئوتید کل و آزاد شده لومینومتری یا HPLC می باشد. همچنین بررسی جذب یا ترشح سروتونین نشاندار شده با مواد رادیو اکتیو نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

فلوسیتومتری

در بیماران خاصی مثل سندرم برنارد سولیریا 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 سودمند است بلکه برای ارزیابی توانایی GP IIb/IIIa جهت انجام تغییرات ساختاری نیز مفید خواهد بود. فلوسایتومتری همچنین می تواند برای شناسایی اختلالات رسپتورهای کلاژن و ترومبین نیز مفید باشد.

ژنوتایپینگ

تست های مولکولی می تواند در تشخیص اختلالات ارثی پلاکتی کمک کننده باشد، ژن های عامل جدیدی شناسایی شده اند که در تشخیص قبل از تولد و مواردی که مطالعه فنوتیپی مقدور نباشند مورد استفاده قرار می‌گیرند. طی مطالعات اخیر بررسی های جامع تری از اختلالات مذکور صورت گرفته است.

سایر مطالعات

ابزار ها و روش های گسترده ای برای(poc(point of care پلاکت ها موجود می باشد که تمرکز اصلی این ابزار ها نظارت بر درمان های ضد پلاکتی در بیماری های قلبی عروقی و بعد از جراحی می باشد، بسیاری از این ابزارهای تشخیصی یا مناسب نیستند یا فاقد اعتبار کافی می باشند. در بین ابزارهای موجود تنها اوپتیمول به طور استثنایی دارای قابلیت بررسی همزمان چند آگونیست مختلف می باشد و می توان گفت که قابل تطبیق با LTA است.

تضمین کیفیت

اگر چه تست مهارت های خارجی (EPT) چندین سالی است که بخشی از برنامه تضمین کیفیت آزمایشگاه ها را به خود اختصاص داده است با این حال تست عملکرد پلاکت به دلیل پیچیدگی آماده سازی نمونه و حمل و نقل در برنامه های EPT چالش‌های منحصر به فردی را ایجاد کرده است. در حال حاضر تعدادی از سازمان ها EPT را برای ارزیابی تست های انعقادی،LTA ، شمارش گرانول متراکم و تفسیر بالینی پیشنهاد می کنند.

خلاصه

روش گام به گامی برای تست عملکرد پلاکت مورد نیاز است. ارزیابی بالینی باید اولین قدم در تعیین نیاز به تست های آزمایشگاهی باشد و با استفاده از یک الگوریتم تشخیصی می‌توان استراتژی تحقیقات را برای پزشکان و آزمایشگاه ها توجیه کرد. در اغلب موارد 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 در تحقیقات اولیه آن ها (چه بالینی چه آزمایشگاهی) ناهنجاری هایی در عملکرد پلاکت مشاهده شده است. تست های تخصصی می تواند شامل LTA با پانل گسترده، بررسی میکروسکوپی، فلوسایتومتری و یا تست‌های ژنتیکی باشد.

References

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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]