DOI: 10.48305/jims.v41.i707.0054

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۰۷/هفته‌ی سوم فروردین ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱/۲۱

تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون بر پارامترهای بیوشیمیایی گلبول قرمز کم–لکوسیت در طول مدت ذخیره‌سازی

بهروز قزلباش[۱]، محمدرضا دیهیم[۲]، آزیتا آذر کیوان[۳]، علی اکبر پورفتح‌اله[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ضایعات ذخیره‌سازی گلبول‌های قرمز (Red blood cell) RBC، ممکن است عملکرد این سلول‌ها را به طور چشمگیری کاهش دهد. یکی از این عوارض، افزایش تدریجی استرس اکسیداتیو است که سبب تخریب RBCها در طی نگهداری آن‌ها می‌شود. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر تغییرات بیوشیمیایی کیسه‌های RBC کم–لکوسیت در طول ذخیره‌سازی طراحی شد.

روش‌ها: مطالعه، از نوع تجربی بود و در سال ۱۳۹۶ در سازمان انتقال خون تهران انجام شد. تعداد ۱۰ کیسه RBC کم–لکوسیت، طبق دستوالعمل‌های استاندارد جمع‌آوری، فرآوری و ذخیره شد. هر واحد به دو قسمت مساوی تحت تیمار با گلوتاتیون یا سرم فیزیولوژی (کنترل) تقسیم شد. نمونه‌گیری از همه‌ی کیسه‌ها طی نقاط زمانی ۳، ۱۴، ۲۱، ۳۵ و ۴۲ روز پس از ذخیره‌سازی به عمل آمد. از روش الایزا برای بررسی تغییرات گلوتاتیون و ۲و۳–دی فسفوگلیسرات (2,3-DPG) و از روش آنزیمی برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی مانند لاکتات–دهیدروژناز (LDH)، غلظت لاکتات و فعالیت آنزیم گلوکز–۶–فسفات–دهیدروژناز (G6PD) استفاده شد.

یافته‌ها: مقدار گلوتاتیون در گروه تیمار شده و گروه شاهد به ترتیب به میزان ۷۰ و ۶۰ درصد مقدار اولیه بود. با افت سطح گلوتاتیون در هفته‌ی انتهایی ذخیره‌سازی، کاهش قابل توجهی در فعالیت G6PD مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). مقدار 2,3-DPG بعد ۴۲ روز از ذخیره‌سازی، تا نزدیک به صفر کاهش یافت. سطح LDH و لاکتات در طول ذخیره‌سازی در هر دو گروه افزایش داشت ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد، غیر از مقدار 2,3-DPG، مابقی معیارهای آزمایشگاهی مورد مطالعه تحت تأثیر گلوتاتیون قرار گرفتند و آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون در کاهش استرس اکسیداتیو مؤثر بود.

واژگان کلیدی: ۲و۳–دی‌فسفوگلیسرات؛ گلوکز ۶ فسفات–دهیدروژناز؛ تزریق خون؛ گلبول قرمز؛ گلوتاتیون

ارجاع: قزلباش بهروز، دیهیم محمدرضا، آذر کیوان آزیتا، پورفتح‌اله علی اکبر. **تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون بر پارامترهای بیوشیمیایی گلبول قرمز کم–لکوسیت در طول مدت ذخیره‌سازی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۰۷): ۶۱–۵۴

مقدمه

کیفیت گلبول‌های قرمز (Red Blood Cell) RBC تهیه شده، تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله روش تهیه و فیلتراسیون فرآورده و همچنین شرایط نگهداری مثل نوع کیسه، محلول نگهدارنده و مدت زمان نگهداری قرار می‌گیرد (۱، ۲). علاوه بر این، RBCها در طول دوران نگهداری دچار تغییرات می‌شوند که منجر به افت عملکرد آن‌ها می‌گردد. این تغییرات شامل کاهش pH (به دلیل افزایش لاکتات)، کاهش میزان آدنوزین–تری–فسفات (Adenosine triphosphate) ATP، کاهش ۲،۳–دی–فسفوگلیسرات (2,3-diphosphoglycerate) 2,3-DPG، افزایش لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase) LDH، انباشته شدن مواد واکنشگر زیستی، افزایش اکسیدان‌ها (Reactive oxygen species) ROS، تجمع پتاسیم خارج سلولی و تغییرات فیزیکی مثل از دست رفتن غشای سلول، تغییرات تقارن لیپیدی غشاء و تشکیل میکروویزیکول در فرآورده است (۳).

تحقیقات و پیشرفت‌های متعددی در زمینه‌ی تهیه‌ی کیسه‌ها و مواد نگهدارنده‌ی فرآورده‌های خونی صورت گرفته است. یافته‌های بدست آمده نشان داده‌اند که تغییرات فیزیکی– شیمیایی در کیسه‌های

۱- استادیار خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی طب انتقال خون، تهران، ایران

۳- استاد خون و سرطان کودکان، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی طب انتقال خون، تهران، ایران

۴- استاد ایمنی‌شناسی پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: بهروز قزلباش: استادیار خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: behroozghezelbash@med.mui.ac.ir

خون فیلتر شده نسبت به فیلتر نشده، کمتر می‌باشد (٤). درحال حاضر، با استفاده از محلول‌های ذخیره‌سازی مدرن (Additive solutions) می‌توان RBCها را تا شش هفته ذخیره‌سازی کرد (٥). مدت زمان ذخیره‌سازی در شرایط آزمایشگاهی، بر اساس زنده ماندن سلول‌ها پس از ٢٤ ساعت از تزریق خون تعیین می‌شود، که باید بیشتر یا مساوی ٧٥ درصد باشد (٦).

در کنار مزایای ذخیره‌سازی طولانی‌مدت RBC، مشکلاتی نیز ایجاد می‌شود. در این راستا، گلیکولیز در RBC با مدت ذخیره‌سازی آن در ارتباط است. از آن‌جا که گلیکولیز تنها مسیر برای تولید انرژی (ATP و NADH) در RBC است، اسید لاکتیک تولید شده در گلیکولیز، منجر به کاهش pH در طول ذخیره‌سازی می‌شود (٧). تغییر شیمیایی دیگر در طی ذخیره‌سازی RBC، کاهش غلظت داخل سلولی 2,3-DPG است. کاهش غلظت این ماده‌ی آلوستریک، منجر به شیفت منحنی تعادل O2-هموگلوبین به سمت چپ، و به طور مؤثر افزایش میل O2 به هموگلوبین می‌گردد. از دست دادن 2,3-DPG در مدت زمان ذخیره‌سازی، باعث کاهش توانایی ارائه‌ی O2 توسط RBC می‌شود (٨). همچنین، در دماهای پایین، متابولیسم گلوکز از طریق مسیر پنتوز فسفات (pentose Phosphate pathway) PPP کاهش می‌یابد، که این نیز یکی دیگر از عوامل کاهنده‌ی گلوکز ٦-فسفات دهیدروژناز (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) G6PD، نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات احیا (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) NADPH و فرایندهای مرتبط با آن است که منجر به از دست دادن فعالیت آنتی‌اکسیدانی RBC در طول ذخیره‌سازی می‌شود (٩). کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در طول ذخیره‌سازی، ممکن است باعث تجمع رادیکال‌های آزاد ROS و در نتیجه افزایش تشکیل همولیز و وزیکول در طول ذخیره‌سازی RBC شود (١٠).

در این مطالعه به دنبال پاسخ به این سؤال بودیم که آیا آسیب‌های ناشی از استرس-اکسیداتیو در کیسه‌های RBC، با افزودن آنتی‌اکسیدانی مثل گلوتاتیون کاهش می‌یابد یا نه؟ تاکنون بررسی‌های اندکی در این خصوص انجام گرفته است. این مطالعه بر پایه‌ی روش‌های آزمایشگاهی با هدف بررسی تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون بر آسیب ذخیره‌سازی در فرآورده‌های RBC فیلتر شده در طول زمان نگهداری (در روزهای ٣، ١٤، ٢١، ٣٤ و ٤٢) انجام شد.

روش‌ها

تهیه‌ی فرآورده‌ی RBC کم-لکوسیت: این مطالعه از نوع تجربی بود و در سال ١٣٩٦ در سازمان انتقال خون تهران انجام شد و از میان کیسه‌های خون به دست آمده از افراد مراجعه‌کننده به مراکز سازمان انتقال خون شهر، تعداد ١٠ کیسه به صورت کاملاً تصادفی انتخاب و وارد مطالعه شدند. جمع‌آوری، فرآوری، فیلتراسیون و ذخیره‌سازی کیسه خون‌ها، طبق روش عملکردی استاندارد SOP (Standard operating procedure) سازمان انتقال خون، انجام شد.

پس از تهیه‌ی RBCهای کم-لکوسیت، هر محصول به دو قسمت مساوی تقسیم شد. قبل از افزودن ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون، از کیسه‌ی اصلی، جهت اندازه‌گیری سطح گلوتاتیون اولیه، نمونه‌گیری به عمل آمد. بر اساس مطالعات قبلی (٢، ١١)، مقدار ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون جهت تیمار کیسه‌ها ٥ میلی‌مول در لیتر تعیین گردید. بدین منظور، به یکی از کیسه‌ها ١ میلی‌لیتر محلول افزودنی گلوتاتیون و به کیسه معادل دیگر، هم حجم گلوتاتیون سرم فیزیولوژی اضافه شد.

نمونه‌گیری از کیسه‌ها: جهت نمونه‌گیری، پس از مخلوط کردن آرام کیسه‌ها، ابتدا محتوای درون کورد توسط رولر به داخل کیسه حاوی فرآورده برگردانده شد. سپس، انتهای کورد در شرایط استریل و در کنار شعله توسط قیچی و پنس جدا شد. مقدار ٣-٢ میلی‌لیتر فرآورده درون کورد را دور ریخته و سپس مقدار ٨ تا ١٠ میلی‌لیتر فرآورده را درون لوله آزمایش ریخته و در انتهای نمونه‌گیری انتهای کورد توسط سیلر مسدود گردید. در این روش هیچ‌گونه آلودگی و یا اکسیژن به داخل کیسه وارد نمی‌شود و لذا محیط کیسه همچنان استریل خواهد ماند. نمونه‌گیری از فرآورده‌ها به این روش در روزهای ٣، ١٤، ٢١، ٣٤ و ٤٢ پس از ذخیره‌سازی RBCها انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار گلوتاتیون: مقدار گلوتاتیون کیسه‌ها، قبل و بعد از افزودن ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون (روز پایانی) با استفاده از کیت ارزیابی گلوتاتیون (ZellBio, Germany) به روش الیزا اندازه‌گیری شد. برای این منظور، طبق دستورالعمل کیت، سوسپانسیون سلولی با رقت حدود ١ میلیون سلول در میلی‌لیتر با استفاده از محلول بافر فسفات (Phosphate-buffered saline) PBS تهیه شد. لیزات سلولی از طریق انجماد و ذوب‌های مکرر بدست آمد. سپس نمونه به مدت ١٠ دقیقه سانتریفوژ (٣٠٠٠ دور در دقیقه) گردید و از مایع رویی جهت ارزیابی‌گیری مقدار گلوتاتیون استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم G6PD. قبل از آماده‌سازی نمونه‌ها، غلظت هموگلوبین (gr/dl) با سل‌کانتر (Sysmex KX-21, Japan) اندازه‌گیری شد. سپس ٢٠٠ میکرولیتر از خون هموژنیزه شده، سه بار با سرم فیزیولوژی ٠/٩ درصد شستشو داده شد. پس از آخرین مرحله‌ی شستشو، به مقدار ٠/٩ میلی‌لیتر از معرف لیزکننده (R3) به RBCها اضافه گردید. پس از ١٥ دقیقه انکوباسیون در دمای ٨-٢ درجه‌ی سانتی‌گراد، مجدداً سانتریفوژ گردید و محلول رویی جهت ارزیابی فعالیت آنزیم G6PD با کیت (Biolabo, France) و

با دستگاه (Hitachi, Japan) به روش آنزیماتیک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به صورت واحد در گرم هموگلوبین گزارش شدند.

اندازه‌گیری میزان 2,3-DPG طبق دستورالعمل کیت ارزیابی 2,3-DPG (ZellBio, Germany) به روش الیزا، سوسپانسیون سلولی با رقت ۱ میلیون سلول در میلی‌لیتر با استفاده از PBS تهیه شد. لیزات سلول‌ها از طریق تکرار انجماد و ذوب مکرر بدست آمد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (در ۳۰۰۰ دور در دقیقه) شدند. از مایع رویی بدست آمده جهت اندازه‌گیری میزان 2,3-DPG استفاده گردید.

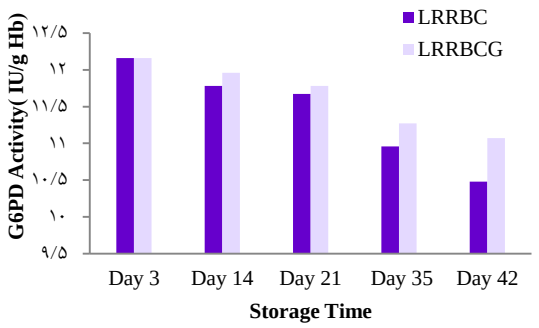
اندازه‌گیری میزان لاکتات و LDH: نمونه‌ی خون جدا شده با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. پلاسمای بدست آمده با استفاده از کیت ارزیابی لاکتات (پارس آزمون، ایران) و با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر شیمی کوباس (Roche, Germany) مورد آنالیز قرار گرفت تا میزان لاکتات و LDH محاسبه شود.

جهت آنالیز داده‌ها و به منظور مقایسه‌ی داده‌ها بین دو گروه از آزمون‌های آماری Paired Samples T-test استفاده شد. همچنین از آنالیز واریانس ANOVA برای مقایسه‌ی معنی‌دار بودن اختلاف داده‌ها در هر گروه نسبت به هفته و روزهای قبل استفاده گردید. مقادیر P < ۰/۰۵، P < ۰/۰۱، P < ۰/۰۰۱ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقدار گلوتاتیون: نتایج بدست آمده نشان داد که با گذشت زمان، میزان گلوتاتیون کیسه‌ها بطور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در مقایسه‌ی تأثیر گلوتاتیون بر مقدار GSH در روز آخر ذخیره‌سازی، اختلاف بین دو گروه معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱). میزان گلوتاتیون کیسه‌ها در گروه تیمار شده و گروه شاهد به ترتیب ۰/۵٤ و ۰/٤۷ میلی‌مول در لیتر RBC بود (جدول ۱).

مقدار فعالیت آنزیم G6PD: نتایج نشان‌دهنده‌ی کاهش میانگین فعالیت آنزیم G6PD در طول روزهای ذخیره‌سازی بود. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان فعالیت آنزیم G6PD در دو گروه در روز اول مطالعه ۱۲/٦ و در روز ٤۲ مطالعه در گروه تیمار شده و گروه شاهد به ترتیب ۱۱/۰۷ و ۱۰/٤۸ واحد در گرم هموگلوبین بود (P < ۰/۰۵) (شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات میزان فعالیت G6PD (بر حسب واحد در گرم هموگلوبین) و مقایسه‌ی تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون بر میزان آن در طی ذخیره‌سازی RBC کم-لکوسیت. میانگین G6PD در ۵ بازه‌ی زمانی مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد (P < ۰/۰۰۱). با گذشت زمان، میزان فعالیت G6PD کیسه‌ها در هر دو گروه بطور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در مقایسه‌ی تأثیر گلوتاتیون بر میزان G6PD، در روزهای ۳۵ و ٤۲، اختلاف بین دو گروه معنی‌دار بود (P < ۰/۰۵). به عبارت دیگر افزودن گلوتاتیون، در بهبود فعالیت G6PD کیسه‌ها مؤثر بوده و میزان فعالیت این آنزیم در گروه تیمار شده با گلوتاتیون نسبت به گروه شاهد بیشتر بود.

LRRBC: Leukoreduced-RBC; LRRBCG: Leukoreduced-RBC+Glutathione; G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

مقدار 2,3-DPG نتایج ارزیابی مقادیر 2,3-DPG در دو گروه RBC کم-لکوسیت با یا بدون گلوتاتیون نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری، مقدار 2,3-DPG کاهش می‌یابد (P > ۰/۰۵). در این راستا، مقدار 2,3-DPG در هر هفته نسبت به هفته‌ی قبل کاهش معنی‌داری نشان داد (P < ۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری بین RBC کم-لکوسیت با و بدون ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون مشاهده نشد (شکل ۲).

جدول ۱. مقدار گلوتاتیون در کیسه‌های RBC کم-لکوسیت مورد مطالعه در طول مدت ذخیره‌سازی

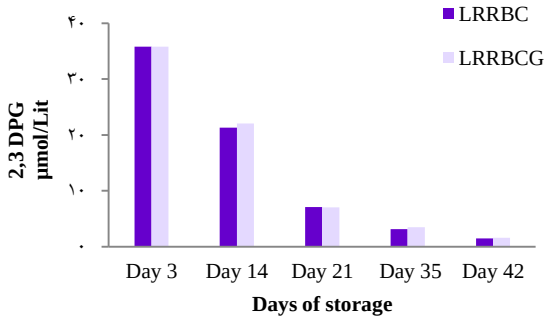
		روز اول	روز چهل و دوم	ANOVA (P)
میزان گلوتاتیون (میلی‌مول در لیتر RBC)	LR-RBC	۰/۷۷ ± ۰/۰۲۲	۰/۴۷ ± ۰/۰۱۷	< ۰/۰۰۱
	RBC+GSH	۰/۷۷ ± ۰/۰۲۲	۰/۵۴ ± ۰/۰۱۹	< ۰/۰۰۱
میانگین ± انحراف معیار	Paired Test (P)	a	< ۰/۰۰۱	

a: The correlation and t cannot be computed because the standard error of the difference is 0.
RBC: Red blood cell; LR-RBC: Leukoreduced-RBC; GSH: Glutathione.

جدول ۲. میانگین لاکتات و لاکتات-دهیدروناژ در دو گروه RBC کم-لکوسیت فاقد و دارای مادهی افزودنی گلوتاتیون در طول مدت نگهداری در روزهای ۳، ۱۴، ۲۱، ۳۵ و ۴۲

		روز سوم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم	روز سی و پنجم	روز چهل و دوم	One-Way ANOVA (P)
لاکتات (mg/dl)	LR-RBC	۹۲/۶۰ ± ۳۵/۱	۷/۳۳ ± ۱۱۴/۴	۹۷/۹۸ ± ۱۴۲/۹	۸۲/۱۹ ± ۱۹۶/۸	۱ ±۲۲۴/۱۲.۷	< ۰/۰۰۱
(میانگین ± انحراف	RBC+GSH	۵/۰۵ ± ۳۵/۶	۱۱/۷۲ ± ۱۰۱/۷	۱۶/۹۳ ± ۱۲۹/۲	۱۳/۵۲ ± ۱۷۹	۱۷/۳۲ ± ۲۰۲/۸	< ۰/۰۰۱
معیار)	Paired Test (P)	a	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	
LDH	LR-RBC	۱۸/۱۷ ± ۱۲۷/۹	۲۲/۳۱ ± ۲۸۷/۷	۲۵±۳۲۴/۱۱.۶۰	۳۰/۰۶ ± ۳۸۷/۱۳	۸۶±۴۱۴/۱۶.۵	< ۰/۰۰۱
واحد در لیتر	RBC+GSH	۱۸/۱۷ ± ۱۲۷/۹	۲۱/۱۵ ± ۲۴۷/۳	۲۳/۴۶ ± ۲۹۸/۱۳	۲۳/۲۹ ± ۳۵۸/۱۸	۱۹/۸ ± ۳۹۱/۱۸	< ۰/۰۰۱
(میانگین ± انحراف	Paired Test (P)	a	۰/۳۴	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	
معیار)							

RBC: Red blood cell; LR-RBC: Leukoreduced-RBC; GSH: Glutathione; LDH: Lactate dehydrogenas.



شکل ۲. تغییرات میزان 2,3-DPG (بر حسب میکرومول در لیتر) و مقایسهی تأثیر مادهی افزودنی گلوتاتیون بر میزان آن در طی ذخیرهسازی RBC کم-لکوسیت. میانگین 2,3-DPG در پنج بازهی زمانی مختلف با یکدیگر اختلاف معنیداری دارند (P < ۰/۰۰۱). در مقایسهی تأثیر گلوتاتیون بر میزان 2,3-DPG، اختلاف معنیداری بین دو گروه مشاهده نشد (P > ۰/۰۵). به عبارت دیگر ماده افزودنی گلوتاتیون، تأثیری بر میزان 2,3-DPG کیسهها در طول ذخیرهسازی نداشته است.

LRRBC: Leukoreduced-RBC; LRRBCG: Leukoreduced-RBC+Glutathione; 2,3 DPG: 2,3-diphosphoglycerate

مقدار لاکتات و LDH: جدول ۲، نشاندهندهی میانگین مقدار لاکتات و LDH در واحدهای RBC کم-لکوسیت پس از گذشت زمان ذخیرهسازی است. بر اساس جدول ۲، با افزایش مدت زمان نگهداری، درصد لاکتات و LDH کیسهها بطور معنیداری افزایش یافت (P < ۰/۰۵). میزان لاکتات و LDH در RBC کم-لکوسیت تیمار شده با مادهی افزودنی گلوتاتیون نسبت به کیسههای فاقد این ماده کمتر بود (P < ۰/۰۵) (جدول ۲).

بحث

تأثیر آسیبهای ذخیرهسازی در فرآوردههای RBC و جنبههای بالینی این آسیبها به طور کامل شناخته شده نیست. در رابطه با آسیبهای ذخیرهسازی و کارآیی و کیفیت RBCهای ذخیره شده، کماکان مطالعات مختلفی در سراسر دنیا در حال انجام است. همانطور که در بخش اول عنوان شد گلوتاتیون یک احیاکنندهی داخل سلولی RBC محسوب میشود و به عنوان یک آنتیاکسیدان نقش مهمی در خنثیسازی اکسیدانهای داخل و سطح سلولی دارد. در این مطالعه از مادهی افزودنی گلوتاتیون به عنوان یک مادهی افزودنی آنتیاکسیدان، جهت کاهش اکسیداسیون و آسیب سلولی فرآوردههای RBC کم-لکوسیت در طول ذخیرهسازی استفاده شد.

نتایج ما نشان داد که تغییرات بیوشیمیایی متعددی در RBCهای ذخیرهسازی شده شکل میگیرد و پارامترهای بیوشیمیایی مثل لاکتات و LDH بصورت زودرس و از هفتههای اول ذخیرهسازی تغییر میکنند. در مقایسهی دو گروه تیمار شده با گلوتاتیون و گروه شاهد، به جز 2,3-DPG، در تمام پارامترهای سنجش شده، اختلاف معنیداری وجود داشت.

از پارامترهای مهم مورد بررسی در این مطالعه، اندازهگیری میزان گلوتاتیون در طول مدت ذخیرهسازی RBCهای فیلتر شده بود. در طول مدت ذخیرهسازی کیسهها، مقدار گلوتاتیون در هر دو گروه به طور چشمگیری کاهش یافت. متوسط گلوتاتیون در روز ۴۲ ذخیرهسازی در مقایسه با روز سوم، تفاوت معنیداری را نشان داد. اما میزان کاهش گلوتاتیون در کیسههای تیمار شده با گلوتاتیون نسبت به کیسههای فاقد این مادهی افزودنی کمتر بود. این یافته با نتایج چندین مطالعه، همسو بود. در دو مطالعهی مستقل توسط Ogunro و همکاران (۹) و Collard و همکاران (۱۲) مشخص شد که میزان آنتیاکسیدان کل در طی نگهداری کیسههای خون کاهش مییابد.

Dumaswala و همکاران پیشنهاد کردند که کاهش میزان گلوتاتیون و گلوتاتیون-پراکسیداز (Plasma glutathione peroxidase) GSH-PX در تغییرات اکسیداتیو لیپیدها، پروتئینها و از دست دادن یکپارچگی غشاء نقش دارند (۱۳).

در مطالعهی دیگری که Whillier و همکاران در ارتباط با

محلول‌های افزودنی از جمله اسیدهای آمینه پیش‌ساز گلوتاتیون (به عنوان گلوتاتیون)، آمینو گوانیدین و گلی‌اکسال انجام دادند، مشاهده کردند که به غیر از اسیدهای آمینه پیش‌ساز گلوتاتیون، بقیه‌ی مواد افزودنی تأثیری در پایداری گلوتاتیون ندارند (۲). این نشان‌دهنده‌ی آن است که با افزودن گلوتاتیون و اسیدهای آمینه پیش‌ساز آن می‌توان سطح گلوتاتیون کیسه‌ها را در حد مطلوبی حفظ کرد.

در مطالعه‌ی دیگر که توسط Pallotta و همکاران بر روی RBCهای ذخیره شده انجام گرفت، از مواد افزودنی ویتامین C و N-استیل سیتئین (N-acetylcysteine) NAC استفاده شد (۱٤). احتمالاً افزودن ویتامین C و NAC موجب سنتز گلوتاتیون می‌شود، هر چند که به نظر می‌رسد علی‌رغم سنتز نباید میزان گلوتاتیون در طول ذخیره‌سازی افزایش می‌یافت. ساز و کار دقیق کاهش سطح گلوتاتیون در RBCها معلوم نیست، اما ممکن است با کاهش G6PD در ارتباط باشد.G6PD آنزیم کلیدی مسیر اکسیداتیو PPP است. در مسیر PPP، NADP+ به شکل احیاء خود، NADPH، تبدیل می‌شود. به نظر می‌رسد این محصول برای حفاظت از گلوتاتیون و استرس-اکسیداتیو ضروری باشد (۱۵).

میانگین فعالیت آنزیم G6PD طی روزهای ذخیره‌سازی نشان‌دهنده‌ی آن است که، با سپری شدن زمان ذخیره‌سازی، میزان فعالیت آن کاهش می‌یابد و افزودن گلوتاتیون، در بهبود فعالیت G6PD کیسه‌ها مؤثر بوده و میزان فعالیت این آنزیم در گروه تیمار شده با گلوتاتیون نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. در این راستا، در دو مطالعه‌ی مستقل نشان داده شده است که میزان فعالیت آنزیم G6PD، در طی روزهای ذخیره‌سازی، کاهش می‌یابد (۱٦، ۱۷).

Reisz و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود نشان دادند که در دو هفته‌ی اول ذخیره‌سازی خون، تفاوت معنی‌داری در فعالیت G6PD وجود نداشت، ولی پس از هفته‌ی سوم و چهارم، ذخیره‌سازی کاهش قابل توجهی در مقایسه با مقادیر پایه دیده شد (۱۸).

نتایج مطالعه‌ی ما نیز مشابه این مطالعات بوده و میزان فعالیت آنزیم G6PD در روز آخر ذخیره‌سازی نسبت به هفته‌ی اول، تقریباً ۲۰ درصد کاهش را نشان داد. در مقابل Francis و همکاران، عنوان کردند که میزان فعالیت آنزیم G6PD در طی روزهای ذخیره‌سازی تغییری نمی‌یابد (۱۹). با توجه به اینکه کیسه‌های RBC باید در دماهای پایین ذخیره‌سازی شوند، متابولیسم گلوکز از طریق مسیر PPP نیز کاهش می‌یابد. این نیز منجر به کاهش فعالیت G6PD، NADPH و فرایندهای مرتبط با آن است که منجربه از دست دادن فعالیت آنتی‌اکسیدانی RBC در طول ذخیره‌سازی می‌شود و در نهایت آسیب و لیز سلولی رخ می‌دهد.

از پارامترهای دیگر اندازه‌گیری شده در این مطالعه، تأثیر زمان نگهداری و ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون بر میزان 2,3-DPG فرآورده‌های RBC کم-لکوسیت می‌باشد. میزان 2,3-DPG در اکسیژن‌رسانی هموگلوبین به بافت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. pH واحدهای RBC در میزان 2,3-DPG اثر دارد، به صورتی که کاهش آن به کمتر از ۷/۲، سبب شکسته شدن 2,3-DPG می‌گردد. در مطالعه‌ی حاضر با گذشت زمان، میزان 2,3-DPG کیسه‌ها بطور قابل توجهی کاهش یافته بود. طوری که از روز ۲۱ به بعد افت شدیدی داشت و نزدیک به صفر بود، در مقایسه‌ی تأثیر گلوتاتیون بر میزان 2,3-DPG، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد. به عبارتی، ماده‌ی افزودنی گلوتاتیون، تأثیری بر میزان 2,3-DPG کیسه‌ها در طول ذخیره‌سازی نداشته است.

Gao و همکاران نشان دادند که با اضافه کردن اتیل پیروات به کیسه‌ها تنها می‌توان به مدت یک هفته موجب حفظ 2,3-DPG در کیسه‌های حاوی CPDA1 citrate phosphate dextrose adenine شد (۲۰). علاوه بر تأثیر دما بر میزان 2,3-DPG، زمان نیز بر مقدار آن مؤثر می‌باشد به طوری که میزان 2,3-DPG پس از ۱۵ تا ۲۱ روز نگهداری، کاهش چشمگیری پیدا می‌کند. اما نتایج بالینی این کاهش حداقل می‌باشد. زیرا این ماده بعد از ۲٤ تا ٤۸ ساعت پس از تزریق خون به حد نرمال خود باز می‌گردد (۲۱).

میزان لاکتات و LDH از دیگر موارد بررسی شده در این مطالعه بود. نتایج حاصل حکایت از آن داشت که با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی RBC، میزان لاکتات و LDH افزایش می‌یابد. همچنین میزان لاکتات و LDH، در کیسه‌های دارای ماده‌ی افزودنی نسبت به کیسه‌های فاقد این ماده کمتر بوده و این کاهش در مقایسه‌ی دو گروه معنی‌دار بود. افزایش لاکتات بیانگر گلیکولیز می‌باشد و RBC به دلیل فقدان میتوکندری، برای تأمین انرژی سلول کاملاً وابسته به مسیر بی‌هوازی گلیکولیز است. تغییرات متابولیتی، عملکرد RBC را نیز متأثر می‌نماید. به طوریکه با افزایش تشکیل لاکتات و کاهش pH، عملکرد فسفاتازها افزایش یافته و منجر به کاهش 2,3-DPG می‌شود.

Arun و همکاران، مشخص کردند که، با استفاده از محلول افزودنی نیکوتینیک اسید و با افزایش غلظت آن، میزان لاکتات و LDH در گروه تیمار شده نسبت به گروه شاهد افزایش کمتری داشت (۲۲). این یافته‌ها تا حدودی مشابه نتایج مطالعه‌ی حاضر بود. از مکانیزم‌های احتمالی که به واسطه‌ی آن، گلوتاتیون می‌تواند سبب کاهش لاکتات، LDH و همولیز شود، می‌توان به کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن به واسطه‌ی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون و به دنبال آن کاهش آسیب ذخیره‌سازی و لیز سلولی اشاره کرد. اینکه آیا از گلوتاتیون و یا مشتقات آن می‌توان به عنوان ماده‌ی افزودنی جهت ارتقاء کیفیت RBC در طول مدت نگهداری استفاده

نمود و یا آیا گلوتاتیون می تواند سبب کاهش عوارض ناشی از تزریق خون‌هایی که در مدت زیادی ذخیره شده‌اند، شود؟ نیاز بـه مطالعـات بیشتری دارد. باید تغییرات بیوشیمیایی و فیزیکی کلی‌تـری را بررسـی نمود تا به تصمیم نهایی رسید. علاوه بر این، هزینه و فایده‌ی محلـول افزودنی نیز باید مدنظر باشد.

نتیجه‌گیری

کیفیت RBCهای تهیه شده، تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیـرد. علاوه بر این، RBCها در دوران نگهداری دچار تغییرات می‌شوند کـه منجر به افت عملکرد آن‌ها می‌گردد. به طـور خلاصـه، یافتـه‌هـای مـا نشان داد، تحت شرایط استاندارد بانک خون، تغییـرات ذخیـره‌سـازی مهمی در پارامترهای بیوشیمیایی اتفـاق مـی‌افتـد کـه شـامل، افـزایش لاکتـات، کـاهش 2,3-DPG و کـاهش G6PD اسـت. ایـن تغییـرات احتمالاً بدنبال مصرف آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید مواد اکسـیدانی در RBC رخ می‌دهد، که منجر به کاهش کیفیت فـرآورده‌هـای RBC و بدنبال آن ممکن است عوارض جـانبی پـس از تزریـق خـون را بـه همراه داشته باشند.

با توجه به اینکه تغییرات چشـمگیر آنتـی‌اکسـیدان‌هـا و اسـترس اکسیداتیو در هفته‌های انتهایی ذخیره‌سازی صورت می‌گیـرد، پیشـنهاد می‌شود در بیماران مستعد اسـترس-اکسـیداتیو نظیـر بیمـاران دیـابتی، سرطان‌ها و افراد مبتلا به بیماری قلبی- عروقی، از کیسه‌های خون بـا زمان اهدای کمتر از دو هفته که دارای حداقل آسیب‌های ذخیره‌سازی هستند، استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه قسمتی از یک پایان‌نامه‌ی دانشجویی مقطع دکتری می‌باشد که در مؤسسه عالی طب انتقال خون تصویب شد و با حمایـت مـالی آن مؤسسه به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمـات مسـؤولین و دست‌اندرکاران مؤسسه عالی طـب انتقـال خـون و از پرسـنل محتـرم بخش بیوشیمی به ویـژه جنـاب آقـای افشـار، پرسـنل محتـرم بخـش نوآوری، پرسنل خوب و زحمـتکش مرکـز تحقیقـات سـازمان انتقـال تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Barshtein G, Pajic-Lijakovic I, Gural A. Deformability of stored red blood cells. Front Physiol 2021; 12: 722896.
2. Whillier S, Raftos JE, Sparrow RL, Kuchel PW. The effects of long-term storage of human red blood cells on the glutathione synthesis rate and steady-state concentration. Transfusion 2011; 51(7): 1450-9.
3. García-Roa M, Del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, Pedraza AC, González-Fernández A, Martín MP, et al. Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. Blood Transfus 2017; 15(3): 222-31.
4. Ghezelbash B, Azarkeivan A, Pourfathollah AA, Deyhim M, Hajati E, Goodarzi A. Comparative evaluation of biochemical and hematological parameters of pre-storage leukoreduction during RBC storage. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2018; 12(1): 35-42.
5. D'Amici GM, Mirasole C, D'Alessandro A, Yoshida T, Dumont LJ, Zolla L. Red blood cell storage in SAGM and AS3: a comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome. Blood Transfus 2012; 10(Suppl 2): s46-54.
6. van de Watering LMG, Brand A. Effects of storage of red cells. Transfus Med Hemother 2008; 35(5): 359-67.
7. Obrador R, Musulin S, Hansen B. Red blood cell storage lesion. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2015; 25(2): 187-99.
8. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. Transfus Med Rev 2005; 19(2): 127-42.
9. Ogunro PS, Ogungbamigbe TO, Muhibi MA. The influence of storage period on the antioxidants level of red blood cells and the plasma before transfusion. Afr J Med Med Sci 2010; 39(2): 99-104.
10. May JM, Qu ZC, Qiao H, Koury MJ. Maturational loss of the vitamin C transporter in erythrocytes. Biochem Biophys Res Commun 2007; 360(1): 295-8.
11. Dumaswala UJ, Wilson MJ, Wu YL, Wykle J, Zhuo L, Douglass LM, et al. Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. Free Radic Res 2000; 33(5): 517-29.
12. Collard K, White D, Copplestone A. The influence of storage age on iron status, oxidative stress and antioxidant protection in paediatric packed cell units. Blood Transfus 2014; 12(2): 210-9.
13. Dumaswala UJ, Zhuo L, Jacobsen DW, Jain SK, Sukalski KA. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. Free Radic Biol Med 1999; 27(9-10): 1041-9.
14. Pallotta V, Gevi F, D'Alessandro A, Zolla L. Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview. Blood Transfus 2014; 12(3): 376-87.
15. Sagiv E, Fasano RM, Luban NLC, Josephson CD, Stowell SR, Roback JD, et al. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient red blood cell units are associated with decreased posttransfusion red blood cell survival in children with sickle cell disease. Am J Hematol 2018; 93(5): 630-4.
16. Nogueira D, Rocha S, Abreu E, Costa E, Santos-Silva A. Biochemical and cellular changes in leukocyte-depleted red blood cells stored for transfusion. Transfus Med Hemother 2015; 42(1): 46-51.
17. D'Alessandro A, Fu X, Kanias T, Reisz JA, Culp-Hill

R, Guo Y, et al. Donor sex, age and ethnicity impact stored red blood cell antioxidant metabolism through mechanisms in part explained by glucose 6-phosphate dehydrogenase levels and activity. Haematologica 2021; 106(5): 1290-302.

18. Reisz JA, Tzounakas VL, Nemkov T, Voulgaridou AI, Papassideri IS, Kriebardis AG, et al. Metabolic linkage and correlations to storage capacity in erythrocytes from glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient donors. Front Med (Lausanne) 2017; 4: 248.

19. Francis RO, Jhang J, Hendrickson JE, Zimring JC, Hod EA, Spitalnik SL. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient red blood cell units in a metropolitan transfusion service. Transfusion 2013; 53(3): 606-11.

20. Gao SQ, Gao SH, Zhu CH, Yuan XY, Ren LX. [Effect of Anti-Oxidative of Ethyl Pyruvate and Taurine on the Red Blood Cell Storage at 4 ℃] [in Chinese]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2022; 30(3): 890-6.

21. Scott AV, Nagababu E, Johnson DJ, Kebaish KM, Lipsitz JA, Dwyer IM, et al. 2,3-Diphosphoglycerate concentrations in autologous salvaged versus stored red blood cells and in surgical patients after transfusion. Anesth Analg 2016; 122(3): 616-23.

22. Arun P, Padmakumaran Nair KG, Manojkumar V, Deepadevi KV, Lakshmi LR, Kurup PA. Decreased hemolysis and lipid peroxidation in blood during storage in the presence of nicotinic acid. Vox Sang 1999; 76(4): 220-5.

DOI: *10.48305/jims.v41.i707.0054*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 707, 3rd Week, April 2023**

Received: 07.01.2023 Accepted: 15.03.2023 Published: 10.04.2023

Effect of Glutathione Additive on Biochemical Parameters of Leukoreduced Red Blood Cell during Storage Period

Behrooz Ghezelbash[1], Mohammad Reza Deyhim[2], Azita Azarkeivan[3], Ali Akbar Pourfatollah[4]

Original Article

Abstract

Background: Red blood cell (RBC) storage lesions may dramatically reduce the function of these cells. One of these complications is the gradual increase in oxidative stress, which causes the destruction of RBCs during their storage. This study was designed to investigate the effect of glutathione additive as an antioxidant on the biochemical changes of leukoreduced-RBC (LR-RBC) bags during storage.

Methods: The study was experimental. In 2016, it was done in Tehran Blood Transfusion Organization. Ten bags of LR-RBC were collected, processed and stored according to standard procedures. Each unit was divided into two equal parts treated with glutathione or normal saline (control). Sampling of all bags was done during the time points of 3, 14, 21, 35 and 42 days after storage. Used the ELISA method to investigate changes in glutathione and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) and the enzymatic method to measure biochemical parameters such as lactate-dehydrogenase (LDH), lactate concentration and glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) enzyme activity.

Findings: The amount of glutathione in the treated group and the control group decreased by 70 % and 60% of the initial value, respectively. With the decrease of glutathione level in the last week of storage, a significant decrease in G6PD activity was observed. The amount of 2,3-DPG decreased to almost zero after 42 days of storage. LDH and lactate increased during storage.

Conclusion: Our results showed that, except for the amount of 2,3-DPG, the rest of the studied parameters were affected by glutathione and glutathione antioxidant was effective in reducing oxidative stress

Keywords: 2,3-diphosphoglycerate; Glucose 6-phosphate dehydrogenase; Blood transfusion; Red blood cell; Glutathione

Citation: Ghezelbash B, Deyhim MR, Azarkeivan A, Pourfatollah AA. **Effect of Glutathione Additive on Biochemical Parameters of Leukoreduced Red Blood Cell during Storage Period.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(707): 54-61.

1- Assistant Professor of Laboratory Hematology and Blood Banking, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Iranian Blood Transfusion Research Center, High Institute for Education and Research in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
3- Professor of Pediatric Hematology and Oncology, Iranian Blood Transfusion Research Center, High Institute for Education and Research in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
4- Professor of Medical Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Behrooz Ghezelbash, Assistant Professor of Laboratory Hematology and Blood Banking, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: behroozghezelbash@med.mui.ac.ir