

تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوکاتایون بر پارامترهای بیوشیمیایی گلبول قرمز کم-لکوسیت در طول مدت ذخیره‌سازی

بهروز قزلباش^۱، محمدرضا دیهیم^۲، آریتا آذر کیوان^۳، علی اکبر پورفتح‌اله^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ضایعات ذخیره‌سازی گلبول‌های قرمز (RBC (Red blood cell)، 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 گلوکاتایون 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 دستورالعمل‌های استاندارد جمع‌آوری، فرآوری و ذخیره شد. هر واحد به دو قسمت مساوی تحت تیمار با گلوکاتایون 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 گلوکاتایون و ۲ و ۳-دی فسفولیپرات (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 گلوکاتایون در گروه تیمار شده و گروه شاهد به ترتیب به میزان ۷۰ و ۶۰ درصد مقدار اولیه بود. با افت سطح گلوکاتایون در هفته‌ی انتهایی ذخیره‌سازی، کاهش قابل توجهی در فعالیت G6PD مشاهده شد ($P < 0.05$). مقدار 2,3-DPG بعد از ۴۲ روز از ذخیره‌سازی، تا نزدیک به صفر کاهش یافت. سطح LDH و لاکتات در طول ذخیره‌سازی در هر دو گروه افزایش داشت ($P < 0.05$).

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

واژگان کلیدی: ۲ و ۳-دی فسفولیپرات؛ گلوکز ۶ فسفات-دهیدروژناز؛ تزریق خون؛ گلبول قرمز؛ گلوکاتایون

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

2,3-DPG (2,3-diphosphoglycerate)، افزایش لاکتات
دهیدروژناز (LDH (Lactate dehydrogenase)، 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
میکروویکول در فرآورده است (۳).
تحقیقات و پیشرفت‌های متعددی در زمینه‌ی تهیه‌ی کیسه‌ها و
مواد نگهدارنده‌ی فرآورده‌های خونی صورت گرفته است. یافته‌های
بدمست آمده نشان داده‌اند که تغییرات فیزیکی-شیمیایی در کیسه‌های

مقدمه

کیفیت گلبول‌های قرمز RBC (Red Blood Cell) 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-فسفولیپرات

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

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

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

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

نویسنده‌ی مسؤول: بهروز قزلباش؛ استادیار خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
Email: behroozghezlbash@med.mui.ac.ir

انتقال خون شهر، تعداد ۱۰ کیسه به صورت کاملاً تصادفی انتخاب و وارد مطالعه شدند. جمع‌آوری، فرآوری، فیلتراسیون و ذخیره‌سازی کیسه خون‌ها، طبق روش عملکردی استاندارد (Standard operating procedure) SOP سازمان انتقال خون، انجام شد.

پس از تهیهی RBCهای کم-لکوسیت، هر محصول به دو قسمت مساوی تقسیم شد. قبل از افزودن مادهی افزودنی گلوکاتایون، از کیسهی اصلی، جهت اندازه‌گیری سطح گلوکاتایون اولیه، نمونه‌گیری به عمل آمد. بر اساس مطالعات قبلی (۲، ۱۱)، مقدار مادهی افزودنی گلوکاتایون جهت تیمار کیسه‌ها ۵ میلی‌مول در لیتر تعیین گردید. بدین منظور، به یکی از کیسه‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول افزودنی گلوکاتایون و به کیسه معادل دیگر، هم حجم گلوکاتایون 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 ۲-۳ میلی‌لیتر فرآورده درون کورد را دور ریخته و سپس مقدار ۸ تا ۱۰ 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 ۳، ۱۴، ۲۱، ۳۴ و ۴۲ پس از ذخیره‌سازی RBCها انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار گلوکاتایون: مقدار گلوکاتایون کیسه‌ها، قبل و بعد از افزودن مادهی افزودنی گلوکاتایون (روز پایانی) با استفاده از کیت ارزیابی گلوکاتایون (ZellBio, Germany) به روش الیزا اندازه‌گیری شد. برای این منظور، طبق دستورالعمل کیت، سوسپانسیون سلولی با رقت حدود ۱ 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 ۱۰ دقیقه سانتی‌فیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) گردید و از مایع رویی جهت ارزیابی‌گیری مقدار گلوکاتایون استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم G6PD: قبل از آماده‌سازی نمونه‌ها، غلظت هموگلوبین (gr/dl) با سل کانت (Sysmex KX-21) (Japan اندازه‌گیری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از خون هموژنیزه شده، سه بار با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد شستشو داده شد. پس از آخرین مرحلهی شستشو، به مقدار ۰/۹ میلی‌لیتر از معرف لیزکننده (R3) به RBCها اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷-۸ درجهی سانتی‌گراد، مجدداً سانتی‌فیوژ گردید و محلول رویی جهت ارزیابی فعالیت آنزیم G6PD با کیت (Biolabo, France) و

خون فیلتر شده نسبت به فیلتر نشده، کمتر می‌باشد (۴). در حال حاضر، با استفاده از محلول‌های ذخیره‌سازی مدرن (Additive solutions) می‌توان RBCها را تا شش هفته ذخیره‌سازی کرد (۵). مدت زمان ذخیره‌سازی در شرایط آزمایشگاهی، بر اساس زنده ماندن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت از تزریق خون تعیین می‌شود، که باید بیشتر یا مساوی ۷۵ درصد باشد (۶).

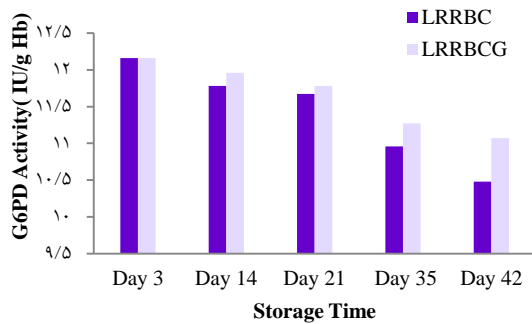
در کنار مزایای ذخیره‌سازی طولانی‌مدت RBC، مشکلاتی نیز ایجاد می‌شود. در این راستا، گلیکولیز در RBC با مدت ذخیره‌سازی آن در ارتباط است. از آن‌جا که گلیکولیز تنها مسیر برای تولید انرژی (ATP و NADH) در RBC است، اسید لاکتیک تولید شده در گلیکولیز، منجر به کاهش pH در طول ذخیره‌سازی می‌شود (۷). تغییر شیمیایی 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 (۸). همچنین، در دماهای پایین، متابولیسم گلوکز از طریق مسیر پنتوز فسفات یکی دیگر از عوامل کاهندهی گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) نیکوتین آمید ادنین دی‌نوکلئوتید فسفات احیا (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) و فرایندهای مرتبط با آن است که منجر به از دست دادن فعالیت آنتی‌اکسیدانی RBC در طول ذخیره‌سازی می‌شود (۹). 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 (۱۰).

در این مطالعه به دنبال پاسخ به این سؤال بودیم که آیا آسیب‌های ناشی از استرس-اکسیداتیو در کیسه‌های RBC، با افزودن آنتی‌اکسیدانی مثل گلوکاتایون 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 گلوکاتایون بر آسیب ذخیره‌سازی در فرآورده‌های RBC فیلتر شده در طول زمان نگهداری (در روزهای ۳، ۱۴، ۲۱، ۳۴ و ۴۲) انجام شد.

روش‌ها

تهیهی فرآوردهی RBC کم-لکوسیت: این مطالعه از نوع تجربی بود و در سال ۱۳۹۶ در سازمان انتقال خون تهران انجام شد و از میان کیسه‌های خون به دست آمده از افراد مراجعه‌کننده به مراکز سازمان

آمده نشان داد که میزان فعالیت آنزیم G6PD در دو گروه در روز اول مطالعه ۱۲/۶ و در روز ۴۲ مطالعه در گروه تیمار شده و گروه شاهد به ترتیب ۱۱/۰۷ و ۱۰/۴۸ واحد در گرم هموگلوبین بود ($P < ۰/۰۰۵$) (شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات میزان فعالیت G6PD (بر حسب واحد در گرم هموگلوبین) و مقایسه‌ی تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوکوتایون 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 کسسه‌ها در هر دو گروه بطور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در مقایسه‌ی تأثیر گلوکوتایون بر میزان G6PD، در روزهای ۳۵ و ۴۲، اختلاف بین دو گروه معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۵$). به عبارت دیگر افزودن گلوکوتایون، در بهبود فعالیت G6PD کسسه‌ها مؤثر بوده و میزان فعالیت این آنزیم در گروه تیمار شده با گلوکوتایون 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 گلوکوتایون نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری، مقدار 2,3-DPG کاهش می‌یابد ($P > ۰/۰۰۵$). در این راستا، مقدار 2,3-DPG در هر هفته نسبت به هفته‌ی قبل کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۰۵$). اختلاف معنی‌داری بین RBC کم-لکوسیت با و بدون ماده‌ی افزودنی گلوکوتایون مشاهده نشد (شکل ۲).

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 سانتریفیوژ 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 $P < ۰/۰۰۵$, $P < ۰/۰۰۱$, $P < ۰/۰۰۱$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقدار گلوکوتایون: نتایج بدست آمده نشان داد که با گذشت زمان، میزان گلوکوتایون کسسه‌ها بطور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در مقایسه‌ی تأثیر گلوکوتایون بر مقدار GSH در روز آخر ذخیره‌سازی، اختلاف بین دو گروه معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$). میزان گلوکوتایون کسسه‌ها در گروه تیمار شده و گروه شاهد به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۷ 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

جدول ۱. مقدار گلوکوتایون در کسسه‌های RBC کم-لکوسیت مورد مطالعه در طول مدت ذخیره‌سازی

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

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-دهیدروناز در دو گروه RBC کم-لکوسیت فاقد و دارای ماده‌ی افزودنی گلوکاتایون در طول مدت نگهداری در روزهای ۳، ۱۴، ۲۱، ۳۵ و ۴۲

One-Way ANOVA (P)	روز سوم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم	روز سی و پنجم	روز چهل و دوم		
< ۰/۰۰۱	۳۵/۱ ± ۹۲/۶۰	۱۱۴/۴ ± ۷/۳۳	۱۴۲/۹ ± ۹۷/۹۸	۱۹۶/۸ ± ۸۲/۱۹	۲۲۴/۱۲/۶ ± ۱	LR-RBC	لاکتات (mg/dl)
< ۰/۰۰۱	۳۵/۶ ± ۵/۰۵	۱۰۱/۷ ± ۱۱/۷۲	۱۲۹/۲ ± ۱۶/۹۳	۱۷۹ ± ۱۳/۵۲	۲۰۲/۸ ± ۱۷/۳۲	RBC+GSH	(میانگین ± انحراف معیار)
< ۰/۰۰۱	a	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	Paired Test (P)	
< ۰/۰۰۱	۱۲۷/۹ ± ۱۸/۱۷	۲۸۷/۷ ± ۲۲/۳۱	۳۲۴/۱۱/۶ ± ۲۵	۳۸۷/۱۳ ± ۳۰/۰۶	۴۱۴/۱۶/۵ ± ۸۶	LR-RBC	LDH
< ۰/۰۰۱	۱۲۷/۹ ± ۱۸/۱۷	۲۴۷/۳ ± ۲۱/۱۵	۲۹۸/۱۳ ± ۲۳/۴۶	۳۵۸/۱۸ ± ۲۳/۲۹	۳۹۱/۱۸ ± ۱۹/۸	RBC+GSH	واحد در لیتر
< ۰/۰۰۱	a	۰/۳۴	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	Paired Test (P)	(میانگین ± انحراف معیار)

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

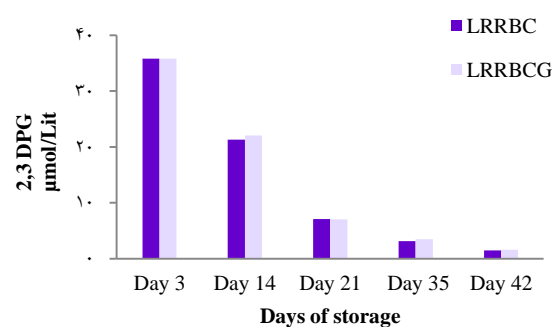
مطالعات مختلفی در سراسر دنیا در حال انجام است. همانطور که در بخش اول عنوان شد گلوکاتایون یک احیاکننده‌ی داخل سلولی RBC محسوب می‌شود و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نقش مهمی در ختنی‌سازی اکسیدان‌های داخل و سطح سلولی دارد. در این مطالعه از ماده‌ی افزودنی گلوکاتایون به عنوان یک ماده‌ی افزودنی آنتی‌اکسیدان، جهت 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 گلوکاتایون 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 گلوکاتایون در طول مدت ذخیره‌سازی RBCهای فیلتر شده بود. در طول مدت ذخیره‌سازی کیسه‌ها، مقدار گلوکاتایون در هر دو گروه به طور چشم‌گیری کاهش یافت. متوسط گلوکاتایون در روز ۴۲ ذخیره‌سازی در مقایسه با روز سوم، تفاوت معنی‌داری را نشان داد. اما میزان کاهش گلوکاتایون در کیسه‌های تیمار شده با گلوکاتایون 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 گلوکاتایون و گلوکاتایون-پراکسیداز (Plasma glutathione peroxidase) در تغییرات اکسیداتیو لیپیدها، پروتئین‌ها و از دست دادن یکپارچگی غشاء نقش دارند (۱۳).

در مطالعه‌ی دیگری که Whillier و همکاران در ارتباط با



شکل ۲. تغییرات میزان 2,3-DPG (بر حسب میکرومول در لیتر) و مقایسه‌ی تأثیر ماده‌ی افزودنی گلوکاتایون 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 گلوکاتایون بر میزان 2,3-DPG، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). به عبارت دیگر ماده‌ی افزودنی گلوکاتایون، 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 گلوکاتایون 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 کارایی و کیفیت RBCهای ذخیره شده، کماکان

نگهداری و ماده‌ی افزودنی گلوکوتایون 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 گلوکوتایون بر میزان 2,3-DPG، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد. به عبارتی، ماده‌ی افزودنی گلوکوتایون، 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 ۲۴ تا ۴۸ 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 بی‌هوایی 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، گلوکوتایون می‌تواند سبب کاهش لاکتات، LDH و همولیز شود، می‌توان به کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن به واسطه‌ی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گلوکوتایون و به دنبال آن کاهش آسیب ذخیره‌سازی و لیز سلولی اشاره کرد. اینکه آیا از گلوکوتایون و یا مشتقات آن می‌توان به عنوان ماده‌ی افزودنی جهت ارتقاء کیفیت RBC در طول مدت نگهداری استفاده

محلول‌های افزودنی از جمله اسیدهای آمینه پیش‌ساز گلوکوتایون (به عنوان گلوکوتایون)، آمینو گوانیدین و گلی‌اکسال انجام دادند، مشاهده کردند که به غیر از اسیدهای آمینه پیش‌ساز گلوکوتایون، بقیه‌ی مواد افزودنی تأثیری در پایداری گلوکوتایون ندارند (۲). این نشان‌دهنده‌ی آن است که با افزودن گلوکوتایون و اسیدهای آمینه پیش‌ساز آن می‌توان سطح گلوکوتایون 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 سیستین (N-acetylcysteine) NAC استفاده شد (۱۴). احتمالاً افزودن ویتامین C و NAC موجب سنتز گلوکوتایون می‌شود، هر چند که به نظر می‌رسد علی‌رغم سنتز نباید میزان گلوکوتایون در طول ذخیره‌سازی افزایش می‌یافت. ساز و کار دقیق کاهش سطح گلوکوتایون 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 گلوکوتایون 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 گلوکوتایون، در بهبود فعالیت G6PD کیسه‌ها مؤثر بوده و میزان فعالیت این آنزیم در گروه تیمار شده با گلوکوتایون 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 (۱۶، 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 منجر به 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

همراه داشته باشند.

با توجه به اینکه تغییرات چشمگیر آنتی‌اکسیدان‌ها و استرس اکسیداتیو در هفته‌های انتهایی ذخیره‌سازی صورت می‌گیرد، پیشنهاد می‌شود در بیماران مستعد استرس-اکسیداتیو نظیر بیماران دیابتی، سرطان‌ها و افراد مبتلا به بیماری قلبی-عروقی، از کیسه‌های خون با 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 حمایت مالی آن مؤسسه به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات مسؤولین و دست‌اندرکاران مؤسسه عالی طب انتقال خون و از پرسنل محترم بخش بیوشیمی به ویژه جناب آقای افشار، پرسنل محترم بخش نوآوری، پرسنل خوب و زحمتکش مرکز تحقیقات سازمان انتقال تقدیر و تشکر می‌شود.

نمود و یا آیا گلوکوتایون می‌تواند سبب کاهش عوارض ناشی از تزریق خون‌هایی که در مدت زیادی ذخیره شده‌اند، شود؟ نیاز به مطالعات بیشتری دارد. باید تغییرات بیوشیمیایی و فیزیکی کلی‌تری را بررسی نمود تا به تصمیم نهایی رسید. علاوه بر این، هزینه و فایده‌ی محلول افزودنی نیز باید مدنظر باشد.

نتیجه‌گیری

کیفیت RBCهای تهیه شده، تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد. علاوه بر این، RBCها در دوران نگهداری دچار تغییرات می‌شوند که منجر به افت عملکرد آنها می‌گردد. به‌طور خلاصه، یافته‌های ما نشان داد، تحت شرایط استاندارد بانک خون، تغییرات ذخیره‌سازی مهمی در پارامترهای بیوشیمیایی اتفاق می‌افتد که شامل، افزایش لاکتات، کاهش 2,3-DPG و کاهش G6PD است. این تغییرات احتمالاً بدنبال مصرف آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید مواد اکسیدانی در RBC رخ می‌دهد، که منجر به کاهش کیفیت فرآورده‌های RBC و بدنبال آن ممکن است عوارض جانبی پس از تزریق خون را به

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. Maturation 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, Coppstone 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, Kaniyas 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 °C] [in Chinese]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2022; 30(3): 890-6.
21. Scott AV, Nagababu E, Johnson DJ, Kebais 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.

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

Behrooz Ghezelbash¹, Mohammad Reza Deyhim², Azita Azarkeivan³, Ali Akbar Pourfatollah⁴

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