گزارش کوتاه
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، بهمن ۱۳۹۳، ۱۰۹۶-۱۰۹۱

بررسی اثر سمیت زایی غشاء پلاکت قابل تزریق(IPM) در موش: یک گزارش کوتاه

ستاره جعفرقلی‌زاده[۱]، صالح نصیری[۲]، عصمت میراب‌زاده اردکانی[۳]، علی‌اکبر سیف‌کردی[۴]

دریافت مقاله: ۹۳/۹/۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۱۰/۲۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۱۱/۴ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: پلاکت‌های خون به طور کلی در بانکهای خون به مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری شده و در صورت عدم استفاده دور ریخته می‌شوند. فراورده غشاء پلاکت قابل تزریق(IPM: Infusible Platelet Membrane) از پلاکت‌های تازه یا تاریخ گذشته انسانی تهیه می‌شود و کاهش زمان خونریزی در حیوان ترومبوسیتوپنیک نظیر خرگوش را تصحیح می‌نماید. طبق استانداردهای فارماکوپه اروپا جهت فراورده‌های دارویی زیستی از آزمایش تعیین سمیت زایی استفاده شد و فراورده مورد آزمایش به موش تزریق می‌گردد. در این مطالعه بررسی اثر سمیت زایی غیر طبیعی فراورده IPM در مدل حیوانی موش مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی جهت تولید فراورده IPM، از پلاکتهای تاریخ منقضی استفاده گردید. ابتدا پلاکت آمیخته شده و با اعمال روش ذوب و انجماد لیز گردید. به منظور غیر فعال کردن آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی به مدت ۲۰ ساعت با استفاده از پایدارکننده سدیم کاپریلات پاستوریزه شده و با ساکارز و سرم آلبومین انسانی فرموله گشته ودر انتها لیوفیلیزه گردید. میزان نیم میلی لیتر از فراورده با غلظت ۲ میلی گرم در کیلوگرم به صورت داخل وریدی به ۵ عدد موش سالم به وزن ۱۷ تا ۲۲ گرم تزریق گردید.

یافته‌ها: مطابق قوانین فارماکوپه اروپا ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از تزریق اگر هیچیک از موش‌ها نمیرند، فراورده مورد قبول واقع می‌گردد و اگر بیش از یک موش بمیرد آزمایش رد می‌گردد و اگر فقط یک موش بمیرد آزمایش تکرار می‌گردد. همچنین، در آزمایش ما هر ۵ موش زنده ماندند.

نتیجه‌گیری: دراین تحقیق نتایج نشان دادند فراورده IPM به عنوان یک جایگزین مناسب برای پلاکت‌ها در حیوان فاقد سمیت‌زایی و ایمن بوده و امکان آن را دارد که در مطالعات بالینی مورد استفاده قرار گیرد و می‌تواند بالقوه به عنوان جایگزین پلاکتی در آینده مصرف شود. با این حال مطالعات بیشتری جهت تأیید جوانب مختلف ایمنی آن نیز باید انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: غشا پلاکت قابل تزریق، جایگزین‌های پلاکتی، سمیت‌زایی

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استاد یار فراورده‌های بیولوژیک مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران
تلفن: ۸۸۶۲۵۴۷۱-۰۲۱ دورنگار: ۸۸۶۲۵۴۷۱-۰۲۱، پست الکترونیکی: salehnasiri2012@gmail.com
۳- دکترای دامپزشکی (D.V.M)، مربی، مرکز تحقیقات انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴-استاد گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-07-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.11.4.5]

مقدمه

پلاکت‌ها، اجزاء کوچک سلولی هستند که نقش مهمی در هموستاز طبیعی به عهده دارند. جهت بیماران مبتلا به کاهش پلاکت و یا اختلال عمل پلاکت، تزریق پلاکت می‌تواند در جلوگیری از خونریزی موثر باشد. پلاکت‌های خون به طور کلی در بانک‌های خون به مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری شده و در صورت عدم استفاده در این مدت حجم زیادی از پلاکت‌های تاریخ منقضی دور ریخته شده و عملا کارایی نداشته و هزینه بالایی را به مراکز انتقال خون تحمیل می‌سازد. لذا بررسی امکان استفاده درمانی از پلاکت‌های تاریخ منقضی به صورت لیوفیلیزه جهت حفظ و نگهداری طولانی مدت آن می‌تواند نقش مهمی را در رفع نیاز بیماران و حل مشکلات مراکز انتقال خون داشته باشد. از طرفی در شرایط بحرانی و بلایای طبیعی، در مواقعی که امکان دسترسی به فراورده پلاکت برای همه وجود ندارد این فراورده لیوفیلیزه دارویی جایگزین، می‌تواند جهت مصدومین مورد استفاده قرار گیرد. از این رو تلاش‌های زیادی در جهت تهیه جایگزین‌های پلاکتی فعال از نظر هموستاز که امکان نگهداری طولانی مدت آنها وجود دارد انجام شده است [۱]. به دلیل این که ذرات کوچک پلاکتی همانند پلاکت‌های سالم ویژگی‌های هموستاتیکی دارند برای محققین منطقی است که اثرات بالقوه جایگزینی پلاکتی آنها را مورد بررسی قرار دهند [۲]. به طور کلی مطالعات انجام شده در این زمینه محدود می‌باشد. تنها یک شرکت آمریکایی به نام Cypress Bioscience این فراورده را تولید نموده و هم اکنون در مرحله فاز ۳ آزمون بالینی قرا دارد و نتایج حاصل سالم بودن محصول، نداشتن عوارض جانبی و عدم افزایش خطر ترومبوز را در گیرندگان نشان داده است [۴-۳]. در مطالعه دیگری اثرات هموستاتیک فعالیت موضعی پیش انعقادی در محل ضایعات عروقی در شرایط ترومبوسایتوپنی مورد تحقیق قرار گرفته و اثرات چسبندگی پلاکتی را در شرایط ترومبوسایتوپنیک متوسط نشان داده است [۵]. آقای Bode و همکارش نشان داده‌اند که پلاکت‌های لیز شده می‌توانند زمان انعقاد را در آزمایش خون هپارینه کاهش دهند [۶]. همچنین، مطالعات دیگری در خصوص روش تهیه غشاء پلاکت انجام شده که در طی آن اثرات هموستاتیک غشاء پلاکت قابل تزریق، در شرایط آزمایشگاه و حیوان مورد تحقیق قرار گرفته است [۸-۷]. لازم به ذکر است قبل از شروع کار آزمایی بالینی داروی تزریقی در انسان علاوه بر موثر بودن دارو و استریلیزاسیون می‌بایست از سمیت زایی آن در حیوان آزمایشگاهی نیز، اطمینان حاصل نمود. تعیین وضعیت سمیت زایی دارو در حیوانات از عوامل مهم در مقبولیت یک داروی تزریقی طبق قوانین فارماکوپه اروپا و امریکا می‌باشد [۹]. به طور کلی هدف از این مطالعه، تهیه فراورده غشا پلاکت قابل تزریق (IPM) به عنوان جایگزین پلاکت از کیسه‌های پلاکت تاریخ منقضی سازمان انتقال خون ایران و همچنین، ارزیابی تأثیر سمیت‌زایی این فراورده در مدل حیوانی، موش سفید کوچک آزمایشگاهی می‌باشد. با انجام این مطالعات می‌توان داروی (IPM) را در صورت مقبولیت از فاز حیوانی به فاز انسانی نزدیک‌تر نمود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی می‌باشد. در ابتدا واحدهای پلاکت تاریخ منقضی از پایگاه انتقال خون تهران تهیه شد. جهت حذف گلبول‌های سفید و قرمز، نمونه

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-07-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.11.4.5]

پلاکت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. سپس به منظور جداسازی پلاکت، مایع روی حاصل از این سانتریفیوژ که حاوی پلاسمای غنی از پلاکت بوده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و رسوب پلاکت حاصل در محلول کلرور سدیم ۹٪ (سرم فیزیولوژی تزریقی) حل گردید. جهت خردسازی غشای سلول پلاکت، فراورده فوق در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منجمد شد و پس از آن در دمای اتاق حداقل به مدت یک ساعت قرار داده شد تا ذوب گردد. این فرایند سه بار تکرار گردید. سپس به منظور خالص‌سازی غشا و حذف محتویات درون سلولی پلاکت، فراورده مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و با محلول کلرور سدیم ۰/۹٪(سرم فیزیولوژی تزریقی) شستشو داده شد. رسوب حاصله جهت اعمال پاستوریزاسیون در حضور پایدارکننده سدیم کاپریلات (ساخت شرکت مرک، آلمان) با غلظت ۰/۲ مولار به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. فراورده‌های دارویی زیستی باید مورد غیر فعالسازی ویروسی قرار گرفته شوند. به این منظور پاستوریزاسیون در انکوباتور ۶۰ درجه که به خوبی هوا در آن گردش داشت صورت پذیرفت. همچنین، پاستوریزاسیون در درجه حرارت یکنواختی انجام گرفت. فراورده حاصل پس از پاستوریزاسیون با ساکارز یک مولار (ساخت شرکت مرک، آلمان) و سرم آلبومین انسانی ۰/۱٪ (ساخت شرکت مرک، آلمان) فرموله گردید و در ویال‌های ۱۲ میلی‌لیتری در شرایط استریل توزیع شد. در پایان ویال‌ها جهت لیوفیلیزاسیون به مرکز انستیتو پاستور کرج منتقل شده و در دستگاه لیوفیلیزاتور قرار داده شدند. پس از اتمام فرایند تولید، جهت حصول اطمینان از سلامت محصول آزمایش استریلیتی انجام گرفت.در پایان جهت بررسی سمیت‌زایی فراورده، تعداد ۵ عدد موش سالم به وزن ۱۷ تا ۲۲ گرم انتخاب گردید. درجه حرارت اتاق نگهداری در دامنه ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت در حدود ۶۰٪ حفظ گردید. پس از سپری شدن دوره سازگاری مطابق با استاندارد فارماکوپه اروپا، فراورده (IPM) به میزان نیم میلی لیتر (غلظت IPM حدود ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) به صورت داخل وریدی در فاصله زمانی ۱۵ تا ۳۰ ثانیه به موش‌ها تزریق شده و سلامت موش‌ها تا ۲۴ ساعت پس از آن تحت نظر قرار گرفت [۹]. در این پژوهش طبق استانداردهای بین‌المللی قوانین اخلاقی رفتار با حیوانات آزمایشگاهی، توسط متخصص دامپزشک و جراح رعایت گردید.

نتایج

مطابق فارماکوپه اروپا جهت فراورده‌های خونی آزمایش استریلیتی به شماره ۱-۶-۲ از نظر باکتری‌های هوازی، بیهوازی و قارچها در محیط‌های کشت انجام شد. در آزمون استریلیتی نتیجه کشت‌ها باید منفی باشد تا فراورده مورد قبول واقع گردد. پس از ۷ روز انکوباسیون محیط‌های کشت شده، هیچگونه رشد میکروبی مشاهده نگردید. مطابق با مستندات فارماکوپه اروپا، معیار تعیین سمیت زایی فراورده‌های تزریقی با مردن یا نمردن مدل حیوانی موش تعیین می‌شود. پس از تزریق فراورده به موشها نتایج بدست آمده نشان داد نمونه در دوز قابل تزریق نیم میلی‌لیتر (غلظت IPM حدود ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) غیر سمی بوده و معیار فارماکوپه اروپا را در مورد فراورده‌های تزریقی پاس (pass) نموده است [۹].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-07-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.11.4.5]

بحث

یکی از روش‌های کنترل کیفی داروهای تزریقی مشتق از پلاسما آزمایش تعیین سمیت‌زایی می‌باشد، که فارماکوپه‌های اروپا و آمریکا بر آن تأکید کرده‌اند. سمیت‌زا بودن یک فراورده ممکن است منجر به شوک یا مرگ حیوان گردد. نتایج کشت منفی فراورده در محیط‌های کشت نشان داد، که فراورده تولیدی فاقد آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی است. این امر بیانگر آن است که روش پاستوریزاسیون در مورد محصول تولیدی به خوبی عمل نموده و یک روش مناسب جهت از بین بردن آلودگیهای ویروسی و باکتریایی می‌باشد. بنابراین سلامت محصول با این روش قابل حصول می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که استفاده از پایدارکننده حرارتی مانند سدیم کاپریلات با غلظت ۰/۲ مولار ، که قبلاً در هیچ یک از مقالات منتشر شده مربوط به فراورده غشا پلاکت قابل تزریق مشاهده نشده، باعث می‌شود فرایند پاستوریزاسیون اثر منفی بر روی کیفیت فراورده بجا نگذارد [۱۰]. با توجه به زنده ماندن موش‌ها نتایج مطالعه سمیت‌زایی ما نشان داد که فراورده IPM فاقد آلودگی بوده است. که دلیل این امر در مطالعه حاضر، مراحل شست و شوی متعدد و مراحل ذوب و انجماد متوالی و در انتها استفاده از روش پاستوریزاسیون و رعایت شرایط استریلیته هنگام پر کردن و لیوفیلیزاسیون می‌باشد. از طرف دیگر در مطالعات آقای Chao و همکاران در مورد ویژگی ترومبوژنیسیته فراورده فوق نیز اثرات نا مطلوبی مشاهده نگردیده بود، که نتایج گذشته از این نظر با مطالعه حاضر همخوانی دارد [۴]. همچنین در مطالعه اخیری که توسط گروه ما انجام شد، مطالعات تب‌زایی فراورده غشاء پلاکت قابل تزریق در خرگوش‌ها نشان داد که این فراورده در مدل حیوانی فوق الذکر به دلیلی عاری بودن از عوامل تب‌زا اثرات نامطلوب تب‌زایی نیز نداشته است [۱۱].

نتیجه‌گیری

مطابق قوانین فارماکوپه اروپا اگرظرف مدت ۲۴ ساعت پس از تزریق هیچکدام از موش‌ها نمیرند این دارو از نظر سمیت‌زایی مشکلی نداشته و آزمایش مورد قبول است. اگر بیش از یک موش بمیرد آزمایش رد می‌گردد و اگر فقط یک موش بمیرد آزمایش می‌باید دوباره تکرار گردد که در تحقیق انجام شده هر ۵ موش سالم ماندند. با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده از این تحقیق و تحقیقات قبلی انجام شده روی فراورده IPM، این محصول می‌تواند پتانسیل استفاده به عنوان یک جایگزین پلاکتی را داشته باشد. البته باید این نکته در نظر گرفته شود که فراورده IPM به عنوان جایگزین پلاکتی نمی‌تواند تمام خواص پلاکت سالم را دارا باشد. اگرچه کارایی دارو در سطح دنیا هنوز به طور کامل مورد قبول واقع نشده است و چالش‌ها همچنان ادامه دارد، اما ادامه تلاشها و تحقیقات در این زمینه می‌تواند در حیطه طب انتقال خون و سلامت بیمار تأثیر شگرف داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سازمان انتقال خون ایران در حمایت از پروژه و همچنین، از همکاری شرکت پالایش و پژوهش خون به ویژه جناب آقای دکتر سیاوش احمدی نوربخش و جناب آقای سعید ریوندی صمیمانه قدردانی می‌شود.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-07-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.11.4.5]

References

[1] Lee DH, Blajchman MA. Novel treatment modalities: New platelet preparations and substitutes. *Br J Haematol* 2001; 114: 496-505.

[2] Blajchman MA. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J ThrombHaemost* 2003; 1: 1637-41.

[3] Kresie L. Artificial blood:an update current red cell and platelet substitutes. *BUMC Proceedings* 2001; 14: 158-61.

[4] Chao FC, Kim BK, Houranieh AM, Liang FH, Konrad MW, Swisher SN, et al. Infusible platelet membrane microvesicles: A potential transfusion substitute for platelets. *Transfusion* 1996; 36: 536-42.

[5] Galan AM, Bozzo J, Hernandez MR, Pino M, Reverter JC, Mazzara R, et al. Infusible platelet membranes improve hemostasis in thrombocytopenic blood: experimental studies under flow conditions. *Transfusion* 2000; 40: 1074-80.

[6] Bode AP, Eick L. Lysed platelets shorten the activated coagulation time (ACT) of heparinized blood. *Am J Pathol* 1989; 91: 430-34.

[7] Nasiri S, Heidari M, Rivandi S. Evaluation of hemostatic effectiveness of infusible platelet membrane in rabbits as a potential substitute for platelet transfusion. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 2012; 2(5): 1-3.

[8] Nasiri S, Heidari M, Rivandi S. Infusible platelet membranes improve hemostasis in thrombocytopenic rabbits: studies with two different injection doses. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research* 2012; 3(12): 4895-8.

[9] British Pharmacopoea. Appendix XIVE. Test for abnormal toxicity. *Ph Eur Method* 2.6.9; 2001.

[10] Nasiri S. Heidari M. Application of sodium caprylate as a stabilizer during pasteurization of infusible platelet membrane and evaluation of its effectiveness by turibidity assay. *International J of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2012; 1(2): 34-6.

[11] Gholizadeh S, Nasiri S, Ahmadi Noorbakhsh S, MirabzadehArdekani E, Rivandi S. Rabbit pyrogen test study of infusible platelet membrane as a platelet substitute for blood transfusion. *J Drug Delivery & Therapeutics* 2014; 4(6): 53-7.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-07-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.11.4.5]

Evaluation of Toxicity Test on Infusible Platelet Membrane in Mice: A Short Report

S. Jafar-Gholizadeh[1], S. Nasiri[2], E. Mirabzadeh Ardakani[3], A. Seyfkordi[4]

Received: 22/11/2014 Sent for Revision: 17/01/2015 Received Revised Manuscript: 24/01/2015 Accepted: 28/01/2015

Background and Objective: Blood platelet units are generally stored in blood banks for 3–5 days, afterwards they are discarded. Prepared infusible platelet membrane (IPM) from fresh or outdated human platelets correct the prolonged bleeding times in thrombocytopenic animals such as rabbits. Abnormal Toxicity is an European Pharmacopoeia standard for assessment of biological products and the test material is administered to the mice. In this study, abnormal toxicity of IPM was evaluated in experimental animal model such as mice.

Materials and Methods: In this experimental study, infusible platelet membrane (IPM) was prepared from outdated platelet concentrates. Platelet concentrates were pooled, disrupted by freeze-thaw procedure, pasteurized for 20 hours to inactivate the possible viral or bacterial contaminants with a sodium caprylate stabilizer, formulated by sucrose and human serum albumin and finally lyophilized. We injected 0.5 ml of IPM (2 mg/kg) intravenously into each 5 health mice, weighing 17-22 grams.

Results: According to the EU Pharmacopeia, the test will be passed if none of animals die during 24 hours after injection. If more than one animal dies, the preparation fails the test. If one of the animals just dies, the test is repeated. In our experiment all five mice were alive.

Conclusion: In this research the results showed that IPM as a platelet substitute is free of abnormal toxicity and safe and it may be used in human clinical trial studies as a feasible approach to develop a platelet substitute in the future. However, further studies are required to confirm the different aspects of its safety as well.

Key words: Infusible Platelet Membrane, Platelet Substitute, Toxicity

Funding: This research was funded by IBTO-Research Center.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Tehran. Azad University, approved the study

How to cite this article: Jafar-Gholizadeh S, Nasiri S, Mirabzadeh Ardakani E, Seyfkordi A. Evaluation of Toxicity Test on Infusible Platelet Membrane in Mice: A Short Report *J RafsanjanUniv Med Sci* 2015; 13(11): 1091-6. [Farsi]

1 - MSc of Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- PhD of Biotechnology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

(Corresponding Author) Tel: (021) 88625471, Fax: (021)88625471, E- mail: salehnasiri2012@gmail.com

3 - DVM, Pasteur Institute,Tehran University,Tehran, Iran

4 - PhD of Chemical Engineering, Sharif University & Islamic Azad University, Tehran, Iran

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-07-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.11.4.5]