



스로 인한 세포 손상을 일으키기 때문에, 그 양을 줄이는 방법이 시도되었다[8-10].

일산화질소(nitric oxide, NO)는 실온보관 중인 혈소판에서 분비되어 여러 경로를 통해 혈소판의 활성화 및 응집을 억제하지만[11-14], 보관기간 동안에 혈소판의 활성화를 억제할 정도의 충분한 양이 나오지는 않는 것으로 알려져 있다[15]. 일산화질소 공여체인 S-nitrosoglutathione (GSNO)은 실온에 보관된 전혈 및 혈소판풍부혈장 상태의 혈소판에 작용하여 adenosine diphosphate (ADP) 유도 P-selectin 발현 및 혈소판 섬유소원 부착을 억제하며, 그 작용 최소 농도는 전혈에서  $10^{-5}$ M, 혈소판풍부혈장에서  $10^{-6}$ M로 보고되었다[16]. 이에 저자들은 냉동혈소판제제를 위한 기초 연구로서 일산화질소가 냉장 및 냉동 온도에서도 혈소판의 활성화를 차단하는 효과가 있는지 알아보기 위해서 GSNO와 DMSO를 처리한 혈소판을 냉장 및 냉동보관하고, 혈소판 응집 촉진제인 ADP와 트롬빈(thrombin)을 처리하여 촉진제 투여 전후의 P-selectin 발현과 혈소판 섬유소원 부착을 유세포 분석기로 측정하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 및 정맥채혈

3주 이상 혈소판의 기능에 영향을 주는 약물을 복용한 적이 없는 건강한 성인 공여자 10명으로부터 정맥혈을 채취하였다. 공여자 중에서 6명은 남자, 4명은 여자였고, 이들의 평균 연령은  $24.9 \pm 0.9$ 세였으며, 모든 대상에게 충분한 설명 후 동의를 받았다. 혈액은 19G 바늘이 달린 10 mL 주사기를 사용하여 3.2% sodium citrate 시험관에 채혈한 후에, 혈소판풍부혈장을 얻기 위해 원심분리(190 g, 10분,  $20^{\circ}\text{C}$ )하였다.

### 2. P-selectin의 발현 및 혈소판 섬유소원 부착의 측정

검체의 처리는 Albert 등[16]이 사용한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 혈소판풍부혈장을  $1 \times \text{HEPES}$  buffered saline (HEPES-BS)과 섞어 혈소판 수가  $1 \times 10^8/\text{mL}$ 가 되도록 희석하고, 희석된 검체  $5 \mu\text{L}$ 를 시험관 24개에 각각 분주하였다. 검체가 분주된 시험관(Cryovial, Simport Plastics Ltd., Quebec, Canada)은 4개의 군으로 조건을 다르게 하여 시약을 첨가하였다. 4개의 군은 동결보호제를 넣지 않은 무첨가군과 GSNO (Sigma, St. Louis, MO, USA)만 넣은 GSNO군, GSNO와 2%의 DMSO (Sigma)를 넣은 GSNO/DMSO군, 그리고 6% DMSO

만 넣은 DMSO군으로 구성하였다. 혈소판의 P-selectin 발현과 섬유소원 부착을 측정하기 위해 단클론항체 형광염색을 시행하였고, phycoerythrin conjugated CD62P (PE-CD62P, Pharmingen Becton Dickinson [BD], Biosciences, San Diego, CA, USA)와 fluorescein isothiocyanate conjugated fibrinogen (FITC-fibrinogen, DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 각각 사용하였다. GSNO는  $1 \times \text{HEPES-BS}$ 로 최종농도가  $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 이 되도록 희석하여 사용하였고, FITC-fibrinogen 및 PE-CD62P 단클론항체는 각각  $5 \mu\text{L}$ 를 넣고 실온에서 2분간 반응시킨 후, 혈소판의 활성화를 촉진시키는 ADP와 트롬빈 (Chrono-Log CORP., Haverton, PA, USA)은 최종 농도  $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 이 되도록 첨가한 후 20분씩 반응시켰고, 반응을 정지시키기 위해서 0.2% formyl saline  $500 \mu\text{L}$ 를 사용하였다. 냉장과 냉동 처리한 검체들은 24시간 후 해동하였고, ADP와 트롬빈은 해동 후 첨가하였으며, 냉동을 위한 검체는  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로  $-70^{\circ}\text{C}$ 까지 온도를 낮춰 보관 후, 해동은  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 시행하였다. 냉장 및 냉동 보관 자체가 혈소판 응집을 억제하므로 트롬빈 처리로 인한 혈소판 응집을 방지하기 위해 사용되는 Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) 펩타이드는 본 실험에 사용하지 않았다.

유세포 분석은 혈소판 활성화 반응 정지 후 1시간 이내에 시행하였고, FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하였으며, 기기에 내장된 CELLQuest (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 forward light scatter (FSC)와 side light scatter (SSC)를 log 증폭하였다. 매 검체마다 5,000개의 혈소판을 획득하였고, ADP와 트롬빈을 처리하지 않은 실온 검체를 정상 대조로 삼아 섬유소원과 CD62P의 단일 지표 히스토그램을 그리고 음성과 양성을 구별하는 임계치를 구하였다(Fig. 1). 임계치를 냉장, 냉동 및 촉진제 투여 후의 검체에서 얻은 히스토그램에 적용하여 섬유소원과 CD62P 양성 혈소판의 백분율을 계산하였다.

### 3. 혈소판의 활성화 및 응집능의 계산

촉진제 투여 전의 P-selectin 발현 및 혈소판 섬유소원 부착은 냉장 및 냉동에 의한 혈소판 활성화를 나타내고, 촉진제 투여 전후 결과의 차이는 혈소판 응집능의 보존 정도로 생각하였다. 촉진제 투여 전후의 결과 차이는 변화비율(delta percent change)로 나타내었는데, 이는 다음의 공식에 따라 계산하였다.

$$D (\%) = (A - B) / B \times 100$$

D : 변화비율

A : 촉진제 투여 후의 결과

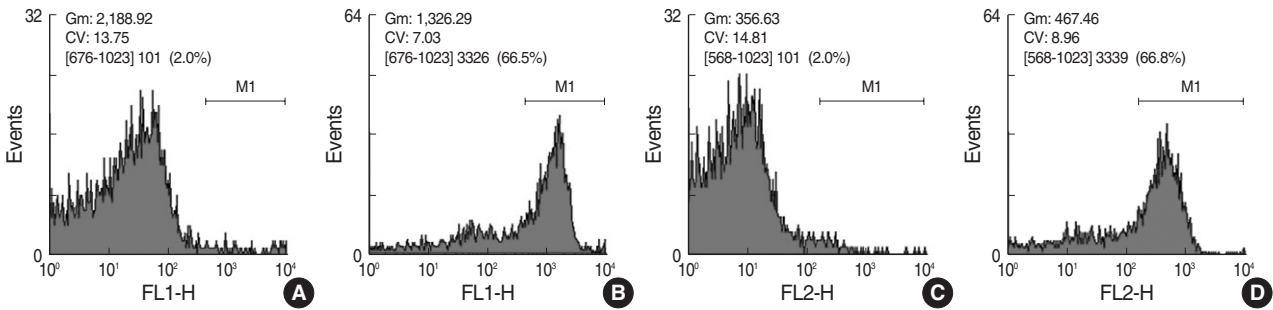


Fig. 1. The histogram of flow cytometric results with fibrinogen (FL1) and CD62P (FL2). A and C show the setting of a threshold discriminating between negative and positive platelets. B and D show the percentage of positive platelets above the threshold.

Table 1. Comparison of P-selectin expression and platelet-bound fibrinogen measured in platelets without treatment of agonists among groups (N=10)

| Marker     | Temp | None      | GSNO      | GSNO/DMSO | DMSO      | P value      |       |              |
|------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-------|--------------|
|            |      |           |           |           |           | N&G          | D&DG  | N&D          |
| P-selectin | R    | 3.1±1.5   | 8.6±7.6   | 5.3±7.3   | 6.1±3.7   | 0.075        | 0.344 | 0.116        |
| P-selectin | C    | 21.3±14.3 | 21.3±11.9 | 29.5±12.5 | 29.6±16.0 | 0.463        | 0.917 | 0.075        |
| P-selectin | F    | 38.5±13.9 | 23.9±9.9  | 25.3±12.8 | 26.7±8.5  | <b>0.028</b> | 0.345 | 0.173        |
| Fibrinogen | R    | 5.5±3.1   | 13.0±12.5 | 8.5±13.0  | 11.7±8.4  | 0.116        | 0.463 | 0.173        |
| Fibrinogen | C    | 23.7±16.7 | 28.2±14.2 | 38.7±16.1 | 42.5±25.5 | 0.249        | 0.600 | <b>0.046</b> |
| Fibrinogen | F    | 40.9±14.3 | 20.6±13.2 | 21.8±18.0 | 36.6±16.4 | <b>0.028</b> | 0.173 | 0.345        |

Abbreviations: R, room temperature; C, cold temperature; F, freezing temperature; N, none; G, GSNO; D, DMSO; DG, GSNO/DMSO.

B : 촉진제투여 전의 결과

활성화는 억제함을 보여주었다(Table 1).

#### 4. 통계처리

통계처리는 SPSS 13.0 for Window (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 각 조건에 따른 섬유소원과 CD62P 양성의 비교는 95% 유의수준으로 분산분석을 이용하여 시행하였고, 같은 온도에서의 다른 조건 검체의 결과 비교에는 Wilcoxon signed ranks test를 사용하였다.  $P < 0.05$ 인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

### 결 과

#### 1. GSNO에 의한 혈소판 활성화의 억제

##### 1) DMSO를 처리하지 않은 혈소판

촉진제를 투여하지 않은 GSNO군 혈소판의 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 실온과 냉장온도 결과는 무첨가군의 결과와 유의한 차이가 없었지만( $P > 0.05$ ), 냉동온도의 결과는 무첨가군의 결과보다 유의하게 낮아( $P < 0.05$ ), GSNO가 냉장보관 혈소판의 활성화에는 영향을 주지 않지만 냉동보관 혈소판의

##### 2) DMSO를 처리한 혈소판

GSNO를 첨가한 GSNO/DMSO군 혈소판의 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 결과는 GSNO가 첨가되지 않은 DMSO군의 결과와 유의한 차이가 없었고( $P > 0.05$ ), 이는 보관온도와 무관하였다(Table 1). GSNO를 처리하지 않은 혈소판에서, DMSO를 처리한 혈소판의 냉동온도에서의 활성화는 실온에 비해 증가되었지만, 이는 DMSO를 처리하지 않은 무첨가군의 증가와 유의하게 다르지 않아, DMSO가 냉동보관 혈소판의 활성화를 억제하지 않음을 보여주었다.

#### 2. GSNO에 의한 혈소판 응집능의 보존

##### 1) DMSO를 처리하지 않은 혈소판

GSNO군 혈소판의 촉진제 투여 후 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착은 무첨가군의 결과와 유의한 차이가 없었고, 이는 보관온도와 무관하였다(Table 2, 3). 실온 및 냉장보관된 GSNO군 혈소판의 ADP 투여 전후 평균 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 변화비율 또한 무첨가군과 유의한 차이가 없었다(Table 4). 그러나, 냉동보관 혈소판의 ADP 투여 전후 평균 P-selectin

**Table 2.** Comparison of P-selectin expression and platelet-bound fibrinogen measured in platelets with treatment of ADP among groups (N=10)

| Marker     | Temp | None      | GSNO      | GSNO/DMSO | DMSO      | P value |              |              |
|------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|--------------|--------------|
|            |      |           |           |           |           | N&G     | D&DG         | N&D          |
| P-selectin | R    | 72.6±3.5  | 69.6±6.3  | 28.3±9.7  | 9.5±5.9   | 0.075   | <b>0.028</b> | <b>0.028</b> |
| P-selectin | C    | 45.1±18.9 | 45.5±20.5 | 29.8±19.0 | 24.2±16.3 | 0.917   | 0.600        | <b>0.028</b> |
| P-selectin | F    | 24.5±10.7 | 29.0±7.5  | 32.3±7.5  | 16.5±3.4  | 0.345   | <b>0.028</b> | 0.173        |
| Fibrinogen | R    | 71.4±5.9  | 70.9±10.1 | 22.2±10.8 | 10.1±10.3 | 0.917   | 0.116        | <b>0.028</b> |
| Fibrinogen | C    | 43.6±17.6 | 44.8±20.0 | 30.1±20.8 | 36.3±19.5 | 0.917   | 0.600        | 0.463        |
| Fibrinogen | F    | 22.8±14.2 | 30.0±10.7 | 29.9±6.5  | 20.0±9.7  | 0.249   | 0.116        | 0.753        |

Abbreviations: See Table 1.

**Table 3.** Comparison of P-selectin expression and platelet-bound fibrinogen measured in platelets with treatment of thrombin among groups (N=10)

| Marker     | Temp | None      | GSNO      | GSNO/DMSO | DMSO      | P value |              |              |
|------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|--------------|--------------|
|            |      |           |           |           |           | N&G     | D&DG         | N&D          |
| P-selectin | R    | 57.8±34.0 | 51.8±38.5 | 46.5±37.9 | 27.5±22.0 | 0.075   | <b>0.046</b> | <b>0.028</b> |
| P-selectin | C    | 53.3±30.3 | 50.0±33.4 | 47.6±32.3 | 37.2±24.8 | 0.753   | 0.173        | 0.046        |
| P-selectin | F    | 49.4±19.5 | 50.4±15.1 | 45.4±29.9 | 29.3±27.5 | 0.917   | <b>0.028</b> | <b>0.028</b> |
| Fibrinogen | R    | 67.3±29.3 | 64.1±24.1 | 58.9±33.3 | 51.7±39.2 | 0.248   | <b>0.028</b> | <b>0.028</b> |
| Fibrinogen | C    | 62.3±22.2 | 61.6±24.1 | 58.1±26.0 | 54.8±32.5 | 0.917   | 0.753        | 0.249        |
| Fibrinogen | F    | 57.6±15.2 | 58.5±9.8  | 47.9±32.2 | 38.7±40.1 | 0.917   | 0.116        | 0.173        |

Abbreviations: See Table 1.

**Table 4.** Comparison of delta percent change of P-selectin expression and platelet-bound fibrinogen measured in platelets with treatment of ADP among groups (N=10)

| Marker     | Temp | None            | GSNO            | GSNO/DMSO       | DMSO        | P value      |              |              |
|------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
|            |      |                 |                 |                 |             | N&G          | D&DG         | N&D          |
| P-selectin | R    | 2,851.7±1,773.4 | 1,234.1±813.5   | 1,048.4±772.9   | 85.1±111.3  | 0.075        | <b>0.046</b> | <b>0.028</b> |
| P-selectin | C    | 235.3±296.9     | 167.6±130.5     | 26.8±134.5      | 50.1±163.6  | 0.463        | 0.917        | 0.173        |
| P-selectin | F    | -35.2±20.0      | 43.3±80.6       | 51.5±75.7       | -29.3±34.2  | <b>0.028</b> | <b>0.028</b> | 0.917        |
| Fibrinogen | R    | 1,772.6±1,457.2 | 1,401.1±1,476.6 | 2,125.2±2,810.5 | 99.1±264.0  | 0.753        | 0.116        | <b>0.028</b> |
| Fibrinogen | C    | 235.3±371.9     | 79.4±88.4       | 27.5±187.0      | 174.2±447.3 | 0.173        | 0.753        | 0.753        |
| Fibrinogen | F    | -45.5±23.7      | 127.9±176.3     | 168.6±225.2     | -32.5±43.4  | <b>0.028</b> | <b>0.028</b> | 0.600        |

Delta percent change is calculated according to next equation.  $D(\%) = [(A-B)/B] \times 100$ . D, delta percent change; A, results after treatment of agonists; B, results before treatment of agonists.

Abbreviations: See Table 1.

발현 및 섬유소원 부착의 변화비율은 무첨가군의 경우 음의 값을 보여 의미가 없는 반면, GSNO군은 평균 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 변화비율이 각각 43.3%와 127.9%로 무첨가군에 비해 유의하게 높았다( $P < 0.05$ ). 냉동보관 혈소판의 트롬빈 투여 전후의 평균 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 변화비율은 무첨가군의 경우 각각 29.9%, 47.0%이었고, GSNO군에서는 135.6%, 293.5%로 나타나 무첨가군에 비해 유의하게 높았다(Table 5).

냉동온도에서 촉진제에 대한 혈소판의 응집 반응은 GSNO를 처리한 혈소판에서 무첨가군에 비해 유의하게 보존됨을 알 수

있었다.

## 2) DMSO를 처리한 혈소판

GSNO를 첨가한 GSNO/DMSO군 혈소판의 촉진제 투여 후 P-selectin 발현은 GSNO를 첨가하지 않은 DMSO군의 결과에 비해 실온과 냉동온도에서 유의하게 높았다(Table 2, 3). 실온 보관된 GSNO/DMSO군 혈소판의 촉진제 투여 전후 평균 P-selectin 발현의 변화비율은 DMSO군에 비해 유의하게 높았지만, 섬유소원 부착은 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4, 5). 냉동보관 혈소판의 ADP 투여 전후 평균 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 변화비율은 무첨가군에 비해 유의하게 높았다.

**Table 5.** Comparison of delta percent change of P-selectin expression and platelet-bound fibrinogen measured in platelets with treatment of thrombin among groups (N=10)

| Marker     | Temp | None            | GSNO            | GSNO/DMSO        | DMSO            | P value      |              |              |
|------------|------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
|            |      |                 |                 |                  |                 | N&G          | D&DG         | N&D          |
| P-selectin | R    | 2,648.7±2,610.8 | 971.4±1053.0    | 3,390.0±5,076.4  | 469.7±497.3     | <b>0.046</b> | <b>0.046</b> | <b>0.028</b> |
| P-selectin | C    | 316.2±419.5     | 232.7±265.3     | 77.5±129.1       | 249.6±540.3     | 0.345        | 0.345        | 0.345        |
| P-selectin | F    | 29.9±38.6       | 135.6±114.4     | 130.5±230.4      | 47.6±209.5      | <b>0.028</b> | <b>0.028</b> | 0.345        |
| Fibrinogen | R    | 1,885.2±2,182.3 | 1,256.0±1,476.7 | 7,238.2±11,580.2 | 1,295.2±2,177.2 | 0.753        | 0.249        | 0.345        |
| Fibrinogen | C    | 393.1±543.2     | 187.8±191.7     | 91.7±135.6       | 716.2±1670.8    | 0.173        | 0.917        | 0.345        |
| Fibrinogen | F    | 47.0±33.2       | 293.5±227.6     | 422.8±667.7      | 108.7±364.7     | <b>0.028</b> | <b>0.028</b> | 0.463        |

Delta percent change is calculated according to next equation.  $D(\%) = [(A-B)/B] \times 100$ . D, delta percent change; A, results after treatment of agonists; B, results before treatment of agonists.

Abbreviations: See Table 1.

유소원 부착의 변화비율은 DMSO군의 경우 음의 값을 보였고, GSNO/DMSO군에서는 각각 51.5%와 168.6%를 보여 응집능이 DMSO군의 결과에 비해 유의하게 보존됨을 나타내었다(Table 4). 또한, 냉동보관 혈소판의 트롬빈 투여 전후의 평균 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 변화비율은 DMSO군의 경우 각각 47.6%, 108.7%로 나타났으나, GSNO/DMSO군에서는 130.5%, 422.8%를 보여 응집능이 DMSO군에 비해 유의하게 보존됨을 보여주었다(Table 5).

GSNO를 첨가하지 않은 DMSO군의 촉진제 투여 후 P-selectin 발현은 무첨가군의 결과에 비해서 실온과 냉장온도에서 유의하게 낮았고, 혈소판 섬유소원 부착은 실온보관의 경우 무첨가군에 비해 유의하게 낮았다(Table 2, 3). 또한, GSNO를 처리하지 않은 실온보관 혈소판에서 DMSO를 처리한 혈소판의 촉진제 투여 전후 평균 P-selectin 발현의 변화비율은 각각 85.1%, 469.7%이었으나, 무첨가군의 경우에는 각각 2,851.7%, 2,648.7%로 나타나 DMSO군의 결과가 무첨가군에 비해 유의하게 낮았다(Table 4, 5). 실온보관 혈소판의 응집능은 DMSO를 처리한 혈소판에서 무첨가군에 비해 유의하게 억제되었다. 냉동보관 혈소판의 경우에는 트롬빈 투여 후 P-selectin 발현이 무첨가군에 비해 유의하게 낮은 것을 제외하고는 무첨가군과 유의한 차이가 없었다.

## 고 찰

본 연구에서는 혈소판의 활성화 정도를 나타내기 위해 혈소판 표면의 P-selectin의 발현과 섬유소원 부착을 유세포 분석기로 측정하였다. 냉장 온도에서의 혈소판 활성화는 혈소판 막의 인지질(phosphatidyl serine)이 세포 내부에서 외부로 이동하는 것으로 알 수 있으며, 이는 annexin V나 P-selectin 발현을 측정함으로써 검출할 수 있다[17, 18]. 또한, 혈소판의 활성

화는 혈소판 막의 glycoprotein (GP) IIb/IIIa 복합체를 섬유소원의 기능적 수용체로 변환시키기 때문에, 섬유소원의 결합 여부를 측정함으로써 혈소판 활성화를 검출할 수 있다[19].

냉동 혈소판은 실온 보관 혈소판에 비해 수혈 후 생존능이 유의하게 감소하며[20], DMSO를 처리한 상태로 혈소판을 냉동시키는 경우, 실온보관 혈소판에 비해 혈소판의 응집능과 분비작용, 삼투스트레스에 대한 저항력은 감소하고, 혈관내피세포에 대한 부착능력이 신선한 혈소판의 40% 정도로 감소한다고 알려져 있다[21, 22]. 본 실험에서 DMSO를 처리한 냉동보관 혈소판의 촉진제 투여 후 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착은 무첨가군 실온보관 혈소판에 비해 유의하게 낮았으며, 변화비율도 음의 값을 보이거나 실온보관 무첨가군에 비해 유의하게 낮은 결과를 보여 기존의 보고와 부합되었다. 또한 DMSO처리 혈소판의 P-selectin의 발현은 냉동시에 급격하게 증가된다고 하였지만[1], 본 실험에서는 이미 냉장 온도에서 실온보다 유의하게 증가하였다(Table 1). 이러한 DMSO의 혈소판에 대한 작용은 가역적이기 때문에, 해동 후에 혈소판을 세척함으로써 극복될 수 있다[23]. 그러나 많은 연구자들은 DMSO 자체의 독성을 줄이기 위해 epinephrine[10], polyethylene glycol[24], ThromboSol[25] 등 다른 동결보호제와의 혼용을 시도하였다.

일산화질소는 혈소판의 생리적 억제인자로 보관중인 혈소판의 P-selectin 발현을 50% 정도 감소시킬 수 있으므로[26], 저자들은 일산화질소를 DMSO와 병용하거나 단독 사용함으로써 혈소판 냉동보관에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각하였다. Nitroglycerin이나 isosorbide dinitrate, GSNO 등 일산화질소를 발생시키는 여러 물질은 일산화질소와 같이 혈소판의 기능을 억제한다고 보고되거나[27, 28], 상반된 결과로 보고되었다[29, 30]. 본 실험의 촉진제 투여 전 P-selectin 발현 및 혈소판 섬유소원 부착 결과는 GSNO가 실온과 냉장온도에 보관된 혈소판의 활성화에는 영향을 주지 않지만, 냉동보관 혈소판의

활성화는 유의하게 억제함을 보여주었다(Table 1). 반면, DMSO를 처리한 혈소판에서는 GSNO가 냉동온도에서도 유의한 영향을 보이지 않았다. 이는 제거되지 않은 DMSO가 GSNO의 혈소판 활성화 억제 작용을 방해하기 때문으로 생각되었다. 촉진제 투여 전후 혈소판의 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착 변화비율은 GSNO가 냉동온도에서 혈소판의 응집능을 보존함을 나타내었고, DMSO와 병용 처리한 경우에도 응집능 보존효과가 있다는 것을 보여주었다(Table 4, 5). 실험결과 중에서 ADP 투여 후의 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착이 ADP 투여 전보다 더 낮은 경우가 냉장 및 냉동보관 혈소판에서 관찰되었다(Table 2, 3). 특히, 무첨가군과 DMSO군의 냉동보관 혈소판에서는 유의한 차이로 나타났고, GSNO가 첨가된 GSNO군 및 GSNO/DMSO군에서는 보이지 않았다. 일반적으로, 촉진제 투여 후의 혈소판 활성화 표지자 결과는 투여 전보다 증가하고, 본 실험의 실온보관 혈소판의 결과도 그러하였다. 냉동보관 혈소판의 결과는 해동한 후에 PE-CD62P와 FITC-fibrinogen 단클론항체로 형광염색을 시행하여 얻어졌기 때문에 냉동과 해동 과정에서 일어난 혈소판의 변화를 모두 반영했다고 볼 수 있다. 혈소판은 냉동에 의해 형태 변화 및 활성화 등의 병적 변화를 거쳐 손상되거나 파괴되는 것으로 알려져 있으며, DMSO의 경우 제거되지 않으면 해동과정에서 삼투스트레스에 의해 혈소판을 파괴한다[7]. 따라서, 동결보호제를 넣지 않은 무첨가군과 6% DMSO를 넣은 DMSO군에서 ADP 투여 후의 결과가 투여 전보다 오히려 낮아진 원인으로 해동 후 투여된 촉진제에 의한 혈소판의 추가적인 파괴를 생각할 수 있지만, 트롬빈의 결과는 투여 후가 전보다 증가되어 ADP 투여 후의 결과는 실험과정의 일부 오류도 완전히 배제할 수 없었다. 그러나, GSNO가 포함된 GSNO군과 GSNO/DMSO군의 혈소판의 결과는 ADP 투여 후의 결과가 투여 전보다 증가되었고 무첨가군에 비해 유의한 차이를 보였기 때문에, GSNO가 냉동온도에서 혈소판의 응집능이 보존되도록 역할을 한 것이라고 추정할 수 있었다.

일산화질소는 흡수된 후 생체 내의 혈소판 기능에 유의한 영향을 주지 못하며[31, 32], 이는 일산화질소가 혈관내피세포를 지나 혈관 내로 들어간 후 oxyhemoglobin과 결합하기 때문으로 알려져 있다[33, 34]. 그러므로, 일산화질소는 혈소판 제제와 함께 수혈된 후에도 안전한 것으로 예상되며, 충분한 임상시험을 거쳐 적용할 수 있을 것으로 생각되었다.

## 요 약

**배경 :** 저자들은 일산화질소가 냉장 및 냉동보관 혈소판의 활

성화를 차단하는 효과가 있는지 알아보기 위해서 S-nitrosoglutathione (GSNO) (Sigma, USA)을 처리하고 냉장 또는 냉동보관한 혈소판의 P-selectin의 발현과 혈소판 섬유소원 부착을 유세포 분석기로 측정하였다.

**방법 :** 건강한 성인 공여자 10명의 정맥혈을 3.2% sodium citrate 시험관에 채혈하여 원심분리로 얻은 혈소판풍부혈장을 4종류의 시험관(동결보호제 무첨가, GSNO, GSNO/dimethyl sulfoxide [DMSO] [Sigma], 그리고 DMSO)에 나눠 분주하고 실온과 냉장, 그리고 냉동 온도에 24시간 보관하였다. 각 검체는 FITC-섬유소원과 PE-CD62P (Becton Dickinson, USA) 단클론항체로 염색하여 유세포분석을 시행하였고, 그 결과를 온도에 따라 비교하고, 촉진제 처리후의 4개 검체군의 결과를 서로 비교하였다.

**결과 :** GSNO는 DMSO를 처리하지 않은 냉동보관 혈소판의 활성화를 유의하게 억제하였지만, DMSO를 처리한 혈소판의 활성화는 억제하지 못하였다. 또한, GSNO는 DMSO의 처리와 무관하게 냉동보관 혈소판의 P-selectin 발현 및 섬유소원 부착의 변화비율을 유의하게 증가시켜 냉동보관 혈소판의 응집능 보존효과가 있음을 나타내었다.

**결론 :** GSNO는 냉동보관 혈소판의 활성화를 차단하였고, 혈소판의 응집능을 보존하였기 때문에, 혈소판 냉동보관의 동결보호제로 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

## 참고문헌

1. Liu JH, Ouyang XL, Shi Q, Luo Q, Li XJ, Wang HB, et al. CD62p expression in platelet during the preparation course of Cryopreserved platelet-rich plasma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2002;10:253-6.
2. Armitage WJ. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiology* 1986;23:116-25.
3. Arnaud FG, Hunt CJ, Pegg DE. Some effects of propane-1,2-diol on human platelets. *Cryobiology* 1990;27:119-29.
4. Dayian G and Pert JH. A simplified method for freezing human blood platelets in glycerol-glucose using a statically controlled cooling rate device. *Transfusion* 1979;19:255-60.
5. Smillie JA, Munro AC, Wood GC, Mitchell R. Cryopreservation of human platelets with polyvinylpyrrolidone. *Transfusion* 1981;21:552-6.
6. Angelini A, Dragani A, Berardi A, Iacone A, Fioritoni G, Torlontano G. Evaluation of four different methods for platelet freezing. *In vitro*

- and in vivo studies. *Vox Sang* 1992;62:146-51.
7. Gao DY, Neff K, Xiao HY, Matsubayashi H, Cui XD, Bonderman P, et al. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 and 8 degrees C) and cryopreservation. *Cryobiology* 1999;38:225-35.
  8. Lozano ML, Rivera J, Corral J, Gonzalez-Conejero R, Vicente V. Platelet cryopreservation using a reduced dimethyl sulfoxide concentration and second-messenger effectors as cryopreserving solution. *Cryobiology* 1999;39:1-12.
  9. Borzini P, Lazzaro A, Mazzucco L, Schiavo R, Connor J, Siena S. Platelet cryopreservation using second-messenger effector and low-dose (2%) dimethyl sulfoxide. In vitro evaluation of post-thawing platelet activity with the platelet function analyzer. *Haematologica* 2000;85:885-7.
  10. Xiao H, Harvey K, Labarrere CA, Kovacs R. Platelet cryopreservation using a combination of epinephrine and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants. *Cryobiology* 2000;41:97-105.
  11. Ekmekci H, Isler I, Sonmez H, Gurel C, Ciftci O, Ulutin T, et al. Comparison of platelet fibronectin, ADP-induced platelet aggregation and serum total nitric oxide (NOx) levels in angiographically determined coronary artery disease. *Thromb Res* 2006;117:249-54.
  12. Marcondes S, Cardoso MH, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, et al. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3434-9.
  13. Stojanovic A, Marjanovic JA, Brovkovich VM, Peng X, Hay N, Skidgel RA, et al. A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation. *J Biol Chem* 2006;281:16333-9.
  14. Hagberg IA, Solvik UO, Opdahl H, Roald HE, Lyberg T. Inhalation of nitric oxide inhibits ADP-induced platelet aggregation and alpha-granule release. *Platelets* 1999;10:382-90.
  15. Buyukkagnici DI, Ilhan O, Kavas GO, Arslan O, Arat M, Dalva K, et al. Effects of plasma nitric oxide levels on platelet activation in single donor apheresis and random donor concentrates. *Transfus Apher Sci* 2007;36:73-8.
  16. Albert J, Daleskog M, Wallen NH. A comparison of the antiplatelet effect of S-nitrosoglutathione in whole blood and platelet-rich plasma. *Thromb Res* 2001;102:161-5.
  17. Xiao HY, Matsubayashi H, Bonderman DP, Bonderman PW, Reid T, Miraglia CC, et al. Generation of annexin V-positive platelets and shedding of microparticles with stimulus-dependent procoagulant activity during storage of platelets at 4 degrees C. *Transfusion* 2000;40:420-7.
  18. Kim SW and Lim YA. Establishment of reference values for platelet activation markers by flow cytometry. *Korean J Lab Med* 2006;26:323-8. (김신원 및 임영애. 유세포분석기를 이용한 혈소판 활성화 표지자 참고치 선정. 대한진단검사의학회지 2006;26:323-8.)
  19. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-43.
  20. Brecher ME, ed. Technical manual. 15th ed. Bethesda, MD.: AABB, 2005.
  21. Owens M, Cimino C, Donnelly J. Cryopreserved platelets have decreased adhesive capacity. *Transfusion* 1991;31:160-3.
  22. Fratantoni JC and Poindexter BJ. Dimethyl sulfoxide: effects on function of fresh platelets and on the viability of platelets in storage. *Transfusion* 1983;23:109-13.
  23. Cetin M, Eser B, Er O, Unal A, Kilic E, Papiroglu T, et al. Effects of DMSO on platelet functions and P-selectin expression during storage. *Transfus Apher Sci* 2001;24:261-7.
  24. Borzini P, Assali G, Riva MR, Bramante M, Sciorelli G. Platelet cryopreservation using dimethylsulfoxide/polyethylene glycol/sugar mixture as cryopreserving solution. *Vox Sang* 1993;64:248-9.
  25. Pedrazzoli P, Noris P, Perotti C, Schiavo R, Ponchio L, Belletti S, et al. Transfusion of platelet concentrates cryopreserved with ThromboSol plus low-dose dimethylsulphoxide in patients with severe thrombocytopenia: a pilot study. *Br J Haematol* 2000;108:653-9.
  26. Wong K and Li X. Nitric oxide infusion alleviates cellular activation during preparation, leukofiltration and storage of platelets. *Transfus Apher Sci* 2004;30:29-39.
  27. Langford EJ, Parfitt A, de Belder AJ, Marrinan MT, Martin JF. A study of platelet activation during human cardiopulmonary bypass and the effect of S-nitrosoglutathione. *Thromb Haemost* 1997;78:1516-9.
  28. Wallen NH, Andersson A, Hjemdahl P. Effects of treatment with oral isosorbide dinitrate on platelet function in vivo; a double-blind placebo-controlled study in patients with stable angina pectoris. *Br J C Pharmacol* 1994;38:63-70.
  29. Karlberg KE, Torfgard K, Ahlner J, Sylven C. Dose-dependent effect of intravenous nitroglycerin on platelet aggregation, and correlation with plasma glyceryl dinitrate concentration in healthy men. *Am J Cardiol* 1992;69:802-5.

30. Karlberg KE, Ahlner J, Henriksson P, Torfgard K, Sylven C. Effects of nitroglycerin on platelet aggregation beyond the effects of acetylsalicylic acid in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1993;71:361-4.
31. Albert J, Wallen NH, Broijersen A, Frostell C, Hjemdahl P. Effects of inhaled nitric oxide compared with aspirin on platelet function in vivo in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)* 1996;91:225-31.
32. Albert J, Norman M, Wallen NH, Frostell C, Hjemdahl P. Inhaled nitric oxide does not influence bleeding time or platelet function in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest* 1999;29:953-9.
33. Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1992;107:745-9.
34. Kelm M and Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 1990;66:1561-75.