

Effect of Platelet-derived Microparticles on the Production of IgG Antibody from Human Peripheral Blood B-Lymphocytes

Maryam Jahromi¹,
Fatemeh Yari²,
Mohamad Ali Esmaeili^{1,3}

¹ MSc in Hematology and Blood Banking, Blood transfusion Research Center, Institute for Research and Education on Transfusion Medicine, Tehran, Iran

² Associate Professor, Blood transfusion Research Center, Institute for Research and Education on Transfusion Medicine, Tehran, Iran

³ Ph.D Student of Hematology and Blood Banking, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received September 26, 2015 Accepted November 2, 2015)

Abstract

Background and purpose: Platelets communicate with different immune cells and can activate B-lymphocytes and induce the production of antibodies from these cells. Platelet microparticles (MPs) originate from platelets and express the surface markers of platelets. This study aimed at investigating the ability of these microvesicles on production of antibodies from B-lymphocytes.

Materials and methods: In this experimental study, platelet MPs were isolated from platelet concentrates and B cells were isolated from human whole blood. Then MPs were co-cultured with B-lymphocytes. In different days of culture, the production of IgG antibodies was studied in the supernatants of culture medium using ELISA method. The results were analyzed by paired-samples t-test. P- value < 0.05 was considered statistically significant.

Results: Platelet MPs stimulate the production of antibodies by B-lymphocytes. During 5-day co-culture, significant increase was observed in the production of IgG antibodies in the test samples (B cells+MPs) compared to the control (B cells in the absence of MPs) (P- value< 0.05).

Conclusion: Platelet MPs can induce IgG production from B cells during in vitro co-culture.

Keywords: Platelet microparticles, B-lymphocytes, Immunoglobulin G

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 267-276 (Persian).

بررسی تاثیر میکروذرات مشتق از پلاکت بر تولید آنتی بادی IgG از لنفوسیت های B خون محیطی انسان

مریم جهرمی^۱

فاطمه یاری^۲

محمد علی اسماعیلی^۳

چکیده

سابقه و هدف: پلاکت‌ها با سلول‌های مختلف ایمنی در ارتباط هستند و می‌توانند موجب فعال‌سازی سلول‌های B و القا تولید آنتی‌بادی از آن‌ها شوند. از آنجایی که میکروذرات پلاکتی از پلاکت‌ها منشأ می‌گیرند و مارکرهای سطح پلاکت‌ها را بیان می‌کنند، در این مطالعه تاثیر میکروذرات پلاکتی بر تولید آنتی‌بادی از سلول‌های B مورد بررسی قرار گرفت تا قابلیت آن‌ها در تولید آنتی‌بادی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، میکروذرات از واحدهای کنسانتره پلاکتی و لنفوسیت‌های B از فراورده خون تازه جدا گردیدند. سپس این میکروذرات با لنفوسیت‌های B در محیط کشت مواجه شدند. در روزهای مختلف کشت، نمونه برداری از سوپ رویی محیط کشت انجام و از نظر تولید آنتی‌بادی IgG با روش الیزا بررسی گردید. نتایج حاصل با استفاده از آزمون آماری paired sample T- test آنالیز و مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میکروذرات پلاکتی موجب تحریک تولید آنتی‌بادی از سلول‌های B می‌گردند. در مقایسه نمونه‌های تست (سلول B مواجه شده با میکروذرات) و کنترل (سلول B بدون مواجهه با میکروذرات)، مشاهده شد که تولید آنتی‌بادی IgG از نمونه‌های تست در طول پنج روز کشت افزایش می‌یابد و این افزایش معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).
استنتاج: میکروذرات مشتق از پلاکت قابلیت القای تولید آنتی‌بادی از کلاس IgG را از سلول‌های B دارند.

واژه های کلیدی: میکروذرات پلاکتی، سلول B، IgG

مقدمه

به طور گسترده از طریق توانایی آن‌ها در آزادسازی مدیاتورهای التهابی بعد از فعال شدن ایجاد می‌گردد (۸،۷). نقش پلاکت‌ها در پاسخ‌های ایمنی و التهابی اساساً از طریق مولکول‌های متعددی از جمله TLR، MHC-1، CD40 و CD40L است (۹). پلاکت‌ها به واسطه بیان مولکول CD40L قادر هستند علاوه بر سلول‌های لنفوسیت و دندریتیک، با پلاکت‌های دیگر، سلول‌های اندوتلیال،

پلاکت‌ها قطعات سلولی بدون هسته مشتق از مگاکاریوسیت‌ها هستند که شناخته شده‌ترین نقش آن‌ها شرکت در انعقاد می‌باشد (۱-۳). این سلول‌ها در سیستم هموستاز و ترومبوز نقش مهمی را ایفا می‌کنند. علاوه بر این، مشخص شده است که پلاکت‌ها در واکنش‌های التهابی، آنژیوژنز و پاسخ‌های ایمنی (ذاتی و آدپتیو) نیز شرکت دارند (۴-۶). فعالیت پلاکت‌ها در ایمنی ذاتی

E-mail: f.yari@ibto.ir

مؤلف مسئول: فاطمه یاری؛ تهران: بزرگراه شهید فضل الله نوری، تقاطع بزرگراه شهید همت، سازمان انتقال خون ایران، ستاد مرکزی

۱. کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی خون شناسی و بانک خون، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۷/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۱۱

فیبروبلاست، ماکروفاژ و مونوسیت نیز تعامل برقرار کند. ماهیت دقیق و نتایج این تعاملات همیشه روشن و مشخص نمی‌باشد، اما مدارکی وجود دارد که سلول‌های اندوتلیال در نتیجه تعامل با CD40L پلاکتی فعال شده و مدیاتورهایی آزاد می‌کنند که برای لوکوسیت‌ها جاذب شیمیایی هستند و التهاب را در محل آسیب تسهیل می‌کنند (۱۰). گزارش‌ها بیانگر آن است که علاوه بر بیان شاخص CD40L در سطح پلاکت‌ها، مولکول CD40L محلول نیز متعاقب فعال شدن پلاکت، از آن‌ها آزاد می‌گردد. از آن‌جا که تعداد پلاکت‌ها در خون محیطی زیاد است، عمده CD40L محلول در پلاسما از پلاکت‌ها مشتق می‌شوند (۹). آسیب حاد ریوی ناشی از دریافت خون (Transfusion Related Acute Lung Injury) یک واکنش نادر اما کشنده انتقال خون است که می‌تواند به علت تعامل CD40L آزاد شده از پلاکت‌ها با نوتروفیل‌های حساس شده ریوی و آزاد شدن گرانول‌های نوتروفیلی ایجاد شود. اعتقاد بر این است که CD40L افزایش یافته در کنسانتره پلاکتی با اتصال به CD40 روی نوتروفیل‌ها موجب تحریک سریع آن‌ها و القا سایتوتوکسیسیته سلول‌های اندوتلیال ریز عروق ریوی انسان با واسطه نوتروفیل می‌شود (۱۱،۱۰). با این وجود شواهد فزاینده‌ای از مطالعات اخیر نشان می‌دهد که پلاکت‌ها در پاسخ‌های ایمنی اکتسابی نیز نقش دارند. در این زمینه مشخص شده که پلاکت‌ها موجب فعال شدن سلول‌های دندریتیک، افزایش پاسخ سلول‌های T، القای تولید آنتی‌بادی IgG از سلول‌های B و افزایش شکل‌گیری مراکز زایا با همکاری سلول‌های T می‌شوند (۵). میکروذرات سلولی جمعیت هتروژنی از وزیکول‌ها با اندازه ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر هستند که از طریق جوانه‌زدن از غشای پلاسمایی سلول آزاد می‌شوند و آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول مادری خود را بیان می‌کنند (۱۲). سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های اندوتلیال، نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، پلاکت و گلبول‌های قرمز تحت تاثیر محرک‌هایی مثل استرس، فعال شدن

کمپلمان، تحریک پیش آپوپتوتیک یا مرگ سلولی میکروذرات سلولی را آزاد می‌کنند (۱۳،۱۴). میکروذرات به‌طور معمول در افراد سالم وجود دارند و سطح پایه آن‌ها به تعادل بین تکثیر، تحریک و تخریب سلولی بستگی دارد (۱۵). اگرچه شکل‌گیری میکروذرات یک پدیده فیزیولوژیکی است، اما تعدادی از فرایندهای پاتولوژیکی شامل بیماری‌های اتوایمونی، التهابی، آترواسکلروزیس و بدخیمی‌ها با افزایش قابل توجه میکروذرات گردشی همراه می‌باشند (۱۲).

میکروذرات مشتق از پلاکت اولین بار در سال ۱۹۶۷ توسط شخصی به نام ولف (Wolf) غبار پلاکتی نامیده شد (۱۶). میکروذرات مشتق از پلاکت، فراوان‌ترین (تقریباً ۹۰-۷۰ درصد) میکروذرات در گردش خون هستند (۱۵) و در تعدیل عملکردهای کلیدی شامل التهاب، هموستاز و آنژیوژنز نقش دارند (۱۷،۱۸). این میکروذرات در فرآورده‌های پلاکتی به مقدار بیش‌تری یافت می‌شوند و اثبات شده است که به واسطه داشتن مولکول‌هایی از قبیل CD40L و P-selectin قابلیت فعال کردن انواع سلول‌های خونی مثل سلول‌های B، نوتروفیل، اندوتلیال و دندریتیک را دارا می‌باشند (۱۹). نشان داده شده است که میکروذرات جدا شده از ضایعات آترواسکلروز با داشتن شاخص CD40L و با اتصال به مولکول CD40 در سطح سلول‌های اندوتلیال، می‌توانند باعث آنژیوژنز در بدن شوند (۲۰). گزارش‌های محدودی وجود دارد مبنی بر این که پلاکت‌ها به واسطه داشتن شاخص‌هایی از قبیل CD40L در ایمنی اکتسابی شرکت نموده و باعث افزایش تولید آنتی‌بادی از سلول‌های B می‌شوند (۹). با توجه به این که میکروذرات مشتق از پلاکت، شاخص‌های سطحی پلاکت را بیان می‌کنند و درصد زیادی از میکروذرات موجود در بدن و کنسانتره‌های پلاکتی را شامل می‌شوند، در این مطالعه سعی بر این شد تا تاثیر میکروذرات مشتق از پلاکت بر سلول‌های B به عنوان یکی از سلول‌های خونی مورد بررسی قرار گیرد. این بررسی می‌تواند در

روشن شدن عملکرد ایمونولوژیک پلاکت ها در بدن بسیار کمک کننده باشد.

مواد و روش ها

در ابتدا ۵ کیسه پلاکت کنسانتره مربوط به هر یک از روزهای مختلف ذخیره سازی (روز دوم، سوم و پنجم ذخیره سازی) و فراورده خون تازه (کمتر از سه روز) از پایگاه انتقال خون منطقه ای و آموزشی استان تهران تهیه گردید. انتخاب کیسه ها به طور تصادفی صورت گرفت و در مورد گروه خونی، حجم و شکل ظاهری کیسه ها هیچ ترجیحی وجود نداشت.

جداسازی میکروذرات پلاکتی

میکروذرات پلاکتی موجود در کنسانتره پلاکتی با استفاده از سانتریفوژ در حداقل سه دور متوالی به صورت زیر جدا گردید: ۱- سانتریفوژ با دور g ۲۵۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه جهت رسوب و جداسازی همه سلول ها از فیصل گلبول های قرمز، سفید و پلاکت ها، ۲- سانتریفوژ با دور g ۱۵۶۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جهت رسوب میکروذرات، ۳- شستشو با بافر فسفات (PBS, ICN Biomedicals, Ohio, USA) و سانتریفوژ با دور g ۱۵۶۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جهت خارج کردن پروتئین های محلول از میکروذرات پلاکتی.

تمامی مراحل کار در شرایط استریل انجام گرفت. پس از به دست آوردن میکروذرات پلاکتی، با به کارگیری پروتئین استاندارد (BSA) و با استفاده از روش برادفورد و دستگاه نانودراپ، غلظت میکروذرات به دست آمده از هر کدام از کیسه های پلاکتی سنجیده شد. هم چنین با استفاده از دستگاه Malvern Zetasizer Nano ZS و با تاباندن نور لیزر با طول موج nm ۶۳۳ به محلول حاوی میکروذرات مشتق از پلاکت، در این دستگاه، اندازه میکروذرات توسط نرم افزار نصب شده در دستگاه محاسبه شد.

بررسی بیان شاخص CD40L در سطح میکروذرات پلاکتی جهت بررسی بیان مولکول CD40L در سطح میکروذرات پلاکتی حاصل از کیسه های پلاکتی، از روش فلوسیتومتری استفاده شد. در لوله میکروتیوب در حجم واکنشی ۱۰۰ میکرولیتر به سوسپانسیون حاوی میکروذرات پلاکتی، ۱ میکرولیتر از آنتی-بادی (Abcam, Cambridge, USA Anti-CD40L) اضافه گردید. پس از انکوباسیون به مدت ۳۵ دقیقه در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد) و در تاریکی، نمونه ها دو بار با PBS شستشو و سانتریفوژ با دور g ۱۵۶۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. سپس به محلول باقی مانده از مرحله قبل، ۱ میکرولیتر از anti-mouse Ig کوئزوگه با FITC اضافه شد. نمونه ها برای ۳۵ دقیقه در یخچال و در تاریکی انکوبه گردید. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، نمونه ها با دستگاه فلوسیتومتری از نظر بیان CD40L بررسی شدند. جهت اطمینان از اختصاصی بودن واکنش ها از ایزوتیپ کنترل استفاده شد.

جداسازی و تهیه سلول های B

برای جداسازی سلول های B از خون کامل، ابتدا سلول های تک هسته ای خون محیطی با به کارگیری محلول فایکول (Lymphodex, Inntrain, Germany) از بقیه سلول ها جدا شدند. سپس با استفاده از روش انتخاب منفی و با به کار بردن آنتی بادی های اختصاصی و به کارگیری ذرات مغناطیسی، جداسازی و تخلیص سلول های B از سایر سلول ها انجام شد.

روش جداسازی به صورت زیر انجام شد: سلول های تک هسته ای خون محیطی از ۵۰ میلی لیتر نمونه خون تازه با روش فایکول به دست آمد. جهت تخلیص سلول های B با استفاده از روش انتخاب منفی، سلول های T، NK یا سلول های کشنده طبیعی و مونوسیت به ترتیب با استفاده از آنتی بادی ضد مارکرهای سطحی اختصاصی CD14، CD16، CD3 (همگنی از Abcam, Cambridge, USA) حذف گردیدند. در ابتدا

مواجهه سلول‌های B با میکروذرات پلاکتی در شرایط کشت و نگهداری به مدت ۵ روز

مواجهه سلول‌های B با میکروذرات پلاکتی در محیط کشت و در شرایط کاملاً استریل صورت گرفت. برای کشت از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای و محیط کشت RPMI واجد ده درصد FBS، ۱ میلی لیتر L-گلوتامین و ۱ میلی لیتر آنتی‌بیوتیک‌های P&S (حاوی ۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰ میلی گرم استرپتومایسین) استفاده گردید. تعداد لئوسیت‌های B (2×10^5 در میلی لیتر)، غلظت میکروذرات (غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر)، برای مواجهه و کشت در نظر گرفته شدند. غلظت‌های ذکر شده پس از یک مطالعه اولیه با به کارگیری غلظت‌های مختلف میکروپارتیکل‌های پلاکتی در محدوده ۱۰۰-۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر انتخاب گردیدند. در چاهک‌های مختلف تست به ترتیب میکروذرات به دست آمده از کیسه‌های پلاکتی دو، سه و پنج روزه به همراه لئوسیت B اضافه گردید. در چاهک‌های کنترل فقط سلول B به محیط کشت اضافه شد. در پایان این مرحله کار، پلیت در انکوباتور 37°C ، CO_2 دار برای مدت ۵ روز نگهداری گردید. در روزهای دوم، سوم و پنجم کشت، نمونه برداری از سوپ رویی محیط کشت جهت بررسی میزان تولید آنتی‌بادی انجام شد. با استفاده از روش Bethyl ELISA Laboratory، میزان تولید آنتی‌بادی IgG ارزیابی گردید. انتخاب روزهای نمونه برداری بر اساس مطالعات مشابه (۹) با در نظر گرفتن زمان بیش تر صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS (نگارش ۲۲) و آزمون آماری paired samples T-Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

۲ میکرولیتر Anti CD16، ۴ میکرولیتر Anti CD14 و ۵ میکرولیتر Anti CD3 به لوله فالكون حاوی سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی اضافه شد و برای مدت ۳۵ دقیقه در دمای یخچال انکوباسیون صورت گرفت. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، سوسپانسیون سلولی دو مرتبه با PBS با دور 2500 rpm به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و سانتریفوژ گردید. سپس ۷۰ میکرولیتر از بیدهای مغناطیسی پوشیده شده با آنتی‌بادی (goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Oslo, Norway) به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و دوباره برای مدت ۳۵ دقیقه در دمای یخچال انکوباسیون صورت گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون دوم، لوله فالكون حاوی سوسپانسیون سلولی در میدان مغناطیسی قرار داده شد تا بیدهای مغناطیسی که به سلول‌های واجد آنتی‌بادی متصل هستند، به دیواره لوله فالكون جذب شوند. سوسپانسیون باقی مانده در لوله فالكون عمدتاً دارای لئوسیت‌های B بود. تمامی این مراحل در شرایط استریل انجام شد. لازم به ذکر است سوسپانسیون سلولی به دست آمده از مرحله قبل، از نظر تعداد لئوسیت B شمارش گردید. برای شمارش سلول‌های B، ۲۰ میکرولیتر تریپان بلو ۰/۴ درصد به ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی افزوده شد و پس از مخلوط نمودن با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری، شمارش سلولی صورت گرفت.

بررسی خلوص سلول‌های B با استفاده از روش فلوسیتومتری به سوسپانسیون سلول‌های B در یک لوله میکروتیوب سه میکرولیتر از Anti-CD19 (Abcam, Cambridge, USA) کونژوگه با فیکواریترین (PE) اضافه شد. میکروتیوب در یخچال و در تاریکی برای ۳۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از گذشت زمان انکوباسیون، بیان CD19 و تعیین خلوص سلول‌های B با استفاده از روش فلوسیتومتری بررسی شد. جهت اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها از ایزوتیپ کنترل استفاده گردید.

یافته ها

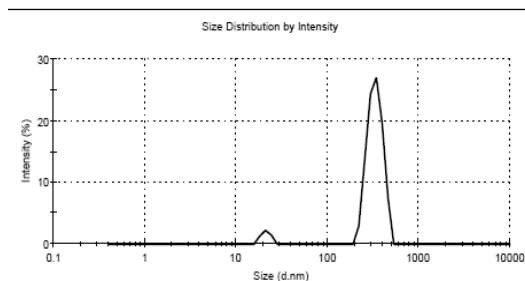
بررسی بیان CD40L بر روی میکروذرات پلاکتی

بررسی ها نشان داد که شاخص CD40L در سطح میکروذرات مشتق از پلاکت بیان می گردد؛ به این دلیل که پلاکت ها، CD40L را در سطح خود بیان می کنند و میکروذرات پلاکتی هنگام شکل گیری از غشای پلاکت این شاخص را نیز بر سطح خود حمل می کنند. میزان بیان این شاخص در سطح میکروذرات حاصل از کنسانتره پلاکتی سه روزه حدود ۶۱ تا ۸۱ درصد تعیین شد (میانگین 71 ± 10 درصد) (تصویر شماره ۱).

تعیین سایز مولکولی میکروذرات پلاکتی

همان طور که در تصویر شماره ۲ مشاهده می نماید، ۲ پیک اصلی که تقریباً کل (۱۰۰ درصد) جمعیت هتروژن میکروویزیکول های مشتق از سلول را نشان می دهند، با اندازه های مولکولی ۳۳۴ و ۲۱/۳ قابل مشاهده هستند که همگی بیانگر اندازه مولکولی کم تر از ۱۰۰۰ نانومتر آن ها است و پیک اصلی بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر قرار دارد.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 384	Peak 1: 334	94.9	61.0
PdI: 0.376	Peak 2: 21.3	5.1	2.37
Intercept: 0.919	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



تصویر شماره ۲: نمودار مرتبط با اندازه میکروویزیکول های مشتق از پلاکت که با دستگاه Zetasizer به دست آمده است

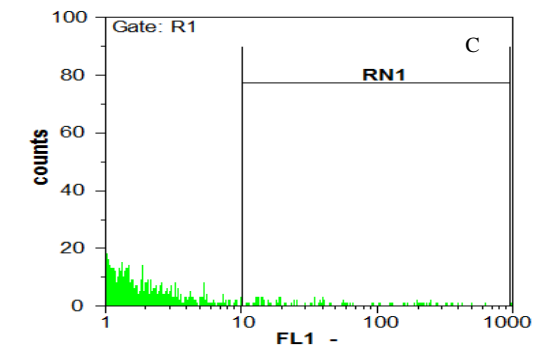
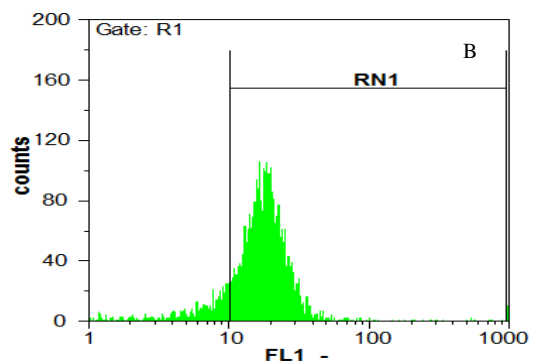
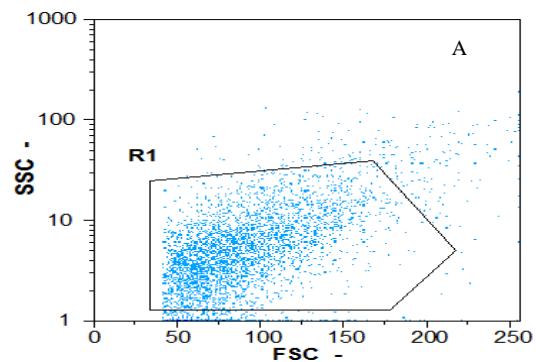
بررسی خلوص سلول های B با استفاده از Anti-CD19

میزان بیان CD19 در سطح سلول های B پس از بررسی نمونه حاوی لئوسیت B با استفاده از فلوسیتومتری، 66 ± 4 درصد به دست آمد. از آنجایی که با این درصد خلوص نتایج خوب به دست آمد، نیازی به اصلاح روش جهت دستیابی به خلوص بیش تر وجود نداشت.

بررسی تاثیر میکروذرات مشتق از پلاکت بر تولید

آنتی بادی IgG

پس از بررسی توتال آنتی بادی IgG در نمونه های تست و کنترل، با استفاده از روش الیزا مشخص شد که در نمونه های تست (سلول های B مواجهه شده با میکروذرات پلاکتی) نسبت به کنترل (سلول های B بدون میکروذرات)، میانگین غلظت آنتی بادی IgG در سوپ رویی محیط کشت در همه روزهای مواجهه



تصویر شماره ۱: نمودار بیان CD40L در سطح میکروذرات حاصل از کنسانتره پلاکتی سه روزه A-نمودار گیت جمعیت میکروذرات B-نمودار بیان CD40L در سطح میکروذرات C-نمودار ایزوتیپ کنترل

میانگین تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های تست بین غلظت ۱۰۰ با ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میکروپارتیکل پلاکتی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$) (جدول شماره ۲). منظور از نمونه‌های میکروپارتیکلی دو، سه و پنج روزه به ترتیب میکروپارتیکل‌های حاصل از کنسانتره‌های پلاکتی در روزهای مختلف ذخیره‌سازی (روز دوم، سوم و پنجم) می‌باشد.

– اعداد ذکر شده غلظت آنتی‌بادی بر اساس نانوگرم در میلی‌لیتر است ($\pm SD$ میانگین).

– میانگین تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های تست در همه روزهای کشت بیش‌تر از کنترل است.

MP2-B (سلول B مواجهه شده با نمونه میکروپارتیکلی دو روزه)

MP3-B (سلول B مواجهه شده با نمونه میکروپارتیکلی سه روزه)

MP5-B (سلول B مواجهه شده با نمونه میکروپارتیکلی پنج روزه)

جدول شماره ۲: مقایسه میزان تولید آنتی‌بادی IgG در نمونه‌های تست و کنترل در غلظت‌های مختلف میکروپارتیکل

غلظت آنتی‌بادی در حضور ۱۰۰ µg/mL از میکروپارتیکل	غلظت آنتی‌بادی در حضور ۵۰۰ µg/mL از میکروپارتیکل	نمونه‌های تست (sample numbers = 5)
۱۱۰±۴۷	۲۰±۴۱۳	میکروپارتیکل دو روزه + سلول (MP2-B) B
۵۹±۱۴۵	۳۵±۵۴۰	میکروپارتیکل سه روزه + سلول (MP3-B) B
۶۰±۱۲۹	۳۲±۴۸۶	میکروپارتیکل پنج روزه + سلول (MP5-B) B
۳۹±۱۲۱	۱۲۱±۳۹	سلول B بدون میکروپارتیکل / کنترل

اعداد نوشته شده غلظت آنتی‌بادی بر اساس نانوگرم در میلی‌لیتر است ($\pm SD$ میانگین).

میانگین تولید آنتی‌بادی IgG، در غلظت ۱۰۰ بیش‌تر از غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از میکروپارتیکل پلاکتی می‌باشد.

نمودارهای ستونی مقایسه‌ای مربوط به میزان تولید آنتی‌بادی IgG در نمونه‌های مختلف تست و کنترل در غلظت میکروپارتیکلی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در روزهای مختلف کشت در تصویر شماره ۳ آورده شده است.

بیش‌تر می‌باشد. نتایج آنالیز نمونه‌های تست نشان داد که مدت روزهای کشت یا مواجهه بر میزان تولید آنتی‌بادی IgG تاثیر دارد. بیش‌ترین میزان تولید آنتی‌بادی IgG در روز سوم کشت پس از مواجهه می‌باشد و بین میانگین تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های تست در روز سوم مواجهه با روزهای دیگر اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). در حالی که بین روزهای دیگر، اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌گردد ($p > 0/05$). نمونه‌های میکروپارتیکلی مختلف از نظر تاثیر بر تولید آنتی‌بادی با هم مقایسه شدند. داده‌ها نشان داد که اگر چه بین میانگین تولید آنتی‌بادی IgG بین نمونه‌های میکروپارتیکلی مختلف (دو، سه و پنج روزه)، اختلاف معنی‌داری ($p > 0/05$) وجود ندارد، اما به ترتیب نمونه میکروپارتیکلی پنج، سه و دو روزه بیش‌ترین میانگین را نشان می‌دهند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه میزان تولید آنتی‌بادی IgG در نمونه‌های تست و کنترل در روزهای مختلف کشت پس از مواجهه (غلظت ۱۰۰ µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی)

روز دوم کشت	روز سوم کشت	روز پنجم کشت	نمونه‌های تست (sample numbers = 5)
۴۴±۱۴۱	۹۳±۴۶۴	۳۲±۱۱۸	میکروپارتیکل دو روزه + سلول (MP2-B) B p (مقایسه نسبت به کنترل) > 0/05
۳۴±۱۳۳	۱۰۶±۵۱۸	۲۶±۱۲۴	میکروپارتیکل سه روزه + سلول (MP3-B) B p (مقایسه نسبت به کنترل) > 0/05
۸۱±۱۶۹	۳۳±۴۸۷	۸۲±۱۴۶	میکروپارتیکل پنج روزه + سلول (MP5-B) B p (مقایسه نسبت به کنترل) > 0/05
۲۱±۱۰۶	۳۱±۱۳۰	۲۴±۱۲۴	سلول B بدون میکروپارتیکل / کنترل

– اعداد ذکر شده غلظت آنتی‌بادی بر اساس نانوگرم در میلی‌لیتر است ($\pm SD$ میانگین).

– میانگین تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های تست در همه روزهای کشت بیش‌تر از کنترل است.

MP2-B (سلول B مواجهه شده با نمونه میکروپارتیکلی دو روزه)

MP3-B (سلول B مواجهه شده با نمونه میکروپارتیکلی سه روزه)

MP5-B (سلول B مواجهه شده با نمونه میکروپارتیکلی پنج روزه)

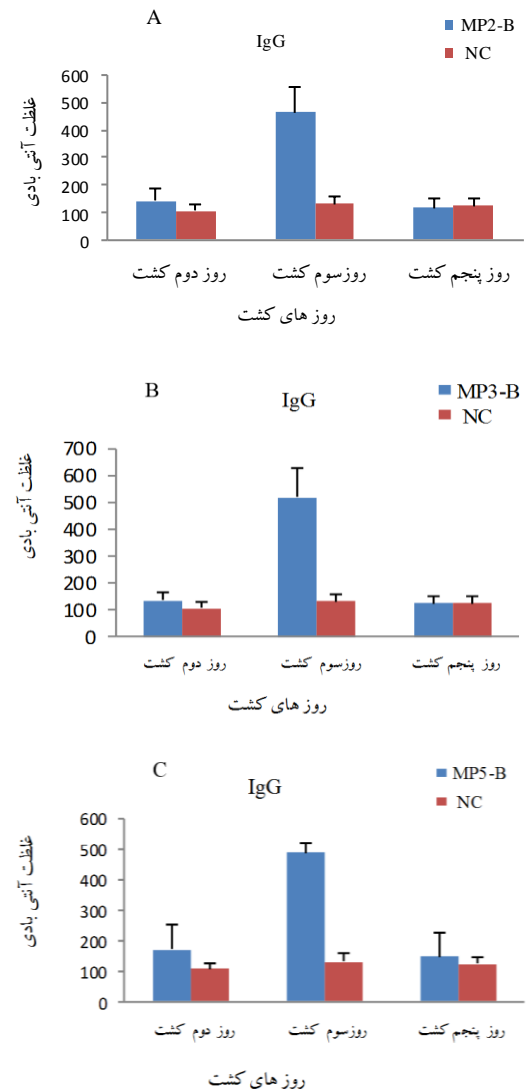
در این مطالعه غلظت‌های مختلف (۵۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) میکروپارتیکل‌های پلاکتی از نظر تاثیر بر تولید آنتی‌بادی IgG بررسی شدند. نتایج نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آن‌ها، بیش‌ترین تاثیر را در تولید آنتی‌بادی IgG دارد و بین

بحث

۲۰۰۷ در فرانسه و دانیل اسپراگ (Daniel. Sprague) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در امریکا انجام شد. Cognasse و همکارانش نشان دادند که در کشت توام پلاکت ها با سلول های B در محیط آزمایشگاه (in vitro)، این دو سلول می توانند همدیگر را فعال کنند. به گونه ای که بیان شاخص های فعال سازی CD62P در سطح پلاکت ها و CD86 در سطح سلول های B افزایش می یابد. آن ها هم چنین نشان دادند که انکوباسیون سه روزه پلاکت ها با سلول های B باعث افزایش تولید آنتی بادی های IgM و IgG می شود (۹). هر چند این پژوهش ها بر روی میکروذرات مشتق از پلاکت انجام نشده بودند، نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می دهد که همانند پلاکت ها، مواجهه میکروذرات مشتق از پلاکت با لنفوسیت های B نیز باعث افزایش تولید آنتی بادی IgG می گردد و در این خصوص غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر موثرتر می باشد.

Sprague ضمن اشاره به تاثیر پلاکت ها بر تولید آنتی بادی، برای اولین بار به بررسی نقش میکروویزیکول های پلاکتی بر فعالیت سلول های B و تولید آنتی بادی و تشکیل مراکز زایا پرداخت. Sprague و همکارانش با آزمایش پلاکت و وزیکول های غشایی مشتق از پلاکت (PDMVs) روی موش های CD40L^{-/-} اثبات کردند که این وزیکول های غشایی به واسطه انتقال سیگنال CD40L، باعث تولید آنتی بادی و شکل گیری مراکز زایا در موش (in vivo) می شوند. Sprague هم چنین در راستای بررسی نقش مرکزی CD40L در میانگش پلاکت ها یا میکروویزیکول های مشتق از پلاکت با سلول های B، مشاهده کرد که بعد از اضافه کردن آنتی بادی ضد CD40L به میکروویزیکول ها قبل از تزریق به موش، تولید آنتی بادی کاهش می یابد. در مطالعه Sprague به منظور تعیین برهمکنش میکروویزیکول های مشتق از پلاکت و لنفوسیت های B، وزیکول های غشایی مشتق از پلاکت در *in vitro* با لنفوسیت های B کشت و مشخص شد که تکثیر

در این مطالعه سعی بر آن شد تا تاثیر میکروذرات مشتق از پلاکت بر تولید آنتی بادی از سلول های B بررسی گردد. اساس کار بر مطالعاتی بود که توسط فابریس کانساس (Fabrice Cognasse) و همکارانش در سال



تصویر شماره ۳: مقایسه میزان تولید آنتی بادی IgG در نمونه های مختلف تست و کنترل در غلظت میکروپارتیکلی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و در روزهای مختلف کشت - A: مقایسه میزان تولید آنتی بادی در نمونه (سلول B مواجهه شده با میکروپارتیکل دو روزه) نسبت به کنترل - B: مقایسه میزان تولید آنتی بادی در نمونه (سلول B مواجهه شده با میکروپارتیکل سه روزه) نسبت به کنترل - C: مقایسه میزان تولید آنتی بادی در نمونه (سلول B مواجهه شده با میکروپارتیکل پنج روزه) نسبت به کنترل

ایجاد شده و مانع اتصال مطلوب آنتی‌بادی موجود در نمونه مورد مطالعه و آنتی‌بادی در سطح پلیت شده و در نتیجه نهایی سنجش تاثیر گذار باشد. هدف این مطالعه، صرفاً بررسی تاثیر میکروپارتیکل‌های پلاکتی بر تولید آنتی‌بادی از لنفوسیت‌های B بوده و مکانیسم اثر گذاری مورد بررسی قرار نگرفت. مطالعات پیش‌تری لازم است تا مولکول‌های دخیل در میانکشدن دو سلول و یا تاثیر گذار در تولید آنتی‌بادی را روشن نماید. در حال حاضر نقش پلاکت‌ها به عنوان سلول‌های ایمنی مطرح شده است (۲۳، ۲۲) و این سلول‌ها می‌توانند با سلول‌های ایمنی دیگر هم‌چون لنفوسیت‌های B واکنش دهند (۹). با کسب نتایجی مشابه با پلاکت‌ها برای میکروپارتیکل‌های پلاکتی، ممکن است میکروپارتیکل‌های پلاکتی به عنوان مولکول‌های واسط ایمنی معرفی گردند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میکروپارتیکل‌های پلاکتی بر تولید آنتی‌بادی از سلول‌های B موثر بوده و این تاثیر آن‌ها وابسته به غلظت پروتئینی میکروپارتیکل‌ها و مدت زمان مواجهه می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد موسسه عالی طب انتقال خون می‌باشد. بدین وسیله از موسسه عالی طب انتقال خون ایران به خاطر حمایت مالی و معنوی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(9): 1381-1389.
2. Hartwig J, Italiano Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7):1580-1586.
3. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355(9214): 1531-1539.
4. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cell Immunol* 2005; 238(1): 1-9.
5. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. Platelet mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003; 19: 9-19.
6. Hundelshausen PV, Weber C. Platelets as Immune Cells: Bridging Inflammation and

لنفوسیت‌های B القا می‌شود، اما تکثیر به صورت ضعیف روی می‌دهد. مورد اخیر بیانگر آن است که تکثیر در محیط *in vivo* پیچیده‌تر از آن است که فقط شاخص CD40L درگیر شده باشد. در عین حال وقتی از میکروویزیکول‌های پلاکتی CD40L-/- استفاده می‌شود، تکثیر لنفوسیت‌های B صورت نمی‌گیرد (۲۱). نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات قبلی از جمله مطالعه Sprague و Cognasse همگی بیانگر این هستند که میکروذرات مشتق از پلاکت می‌توانند با سلول‌های B برهم کنش داده و علاوه بر افزایش فعالیت آن‌ها باعث تحریک تولید آنتی‌بادی از این سلول‌ها گردند. با این تفاوت که مطالعه حاضر در *in vitro* و در حضور غلظت‌های متفاوت میکروپارتیکل پلاکتی انجام شده و توانسته در این خصوص غلظت بهینه را جهت تحریک تولید آنتی‌بادی به دست آورد و حتی تاثیر روزهای نگهداری را در رابطه با اثر میکروپارتیکل‌های پلاکتی بر تولید آنتی‌بادی از سلول‌های B نشان دهد که در نوع خود مطالعه مشابهی دیده نشده است. در توجیه کاهش میزان آنتی‌بادی‌های قابل تشخیص در روز پنجم کشت، به نظر می‌رسد بسیاری از مولکول‌های آنتی‌بادی تولید شده در محیط کشت در روز پنجم کشت، به علت تغییر آرایش فضایی، توسط آنتی‌بادی‌های کیت الیزا مورد استفاده قابل تشخیص نمی‌باشند. احتمال دیگر آن است که در اثر افزایش غلظت آنتی‌بادی، ممانعت فضایی

- Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2007; 100(1): 27-40
7. Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 196(1): 1-11.
8. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22(9): 913-922.
9. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Chavarin P, Cogné M, Richard Y, et al. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp Hematol* 2007; 35(9): 1376-1387.
10. Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb Res* 2011; 127(3): 180-183
11. Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2006; 108(7): 2455-2462.
12. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107(9): 1047-1057.
13. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 2006; 20(1): 1-26.
14. Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood Transfus* 2010; 8(Suppl 3): s31-38.
15. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 30(2): 111-142.
16. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13(3): 269-288.
17. Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 2000; 165(3): 1259-1265.
18. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* 2007; 66(2-3): 159-165.
19. Esmaili MA, Yari F, Sharifi Z, Nikougoftar M, Fadaei R. Effects of Platelet Microparticles on the Activation of B Cells. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*. 2013; 15(4): 1-10.
20. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Lesèche G, Devue C, Duriez M, et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(16): 1302-1311.
21. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 2008; 111(10): 5028-5036.
22. Tamagawa-Mineoka R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. *J Dermatol Sci* 2015; 77(2): 93-101.
23. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* 2014; 123(8): 2759-2767.