ORIGINAL ARTICLE

Effects of Glycosylation on the Function and Phagocytosis of Platelets during Storage of Platelet Concentrate in Cold

Mitra Eslamdoost[1],
Fatemeh Yari[2],
Mahin Nikoogoftar[3],
Minoo Ahmadinezhad[3],
Mohammadreza Tabatabaie[1],
Razieh Fadaie[1]

[1] MSc in Hemotalogy and Blood Banking, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

(Received October 31, 2013 ; Accepted July 13, 2014)

Abstract

Background and purpose: Cold storage results in clustering of gpIbα molecules on platelets. Consequently, the lectin domains of αMβ2 receptors on the liver macrophages recognize these molecules and ingest the platelets. Probably coverage of sugar molecules of gpIbα using galactose could prevent the recognition and ingestion of platelets by macrophages. The purpose of this study therby was to investigate this function.

Material and methods: Twenty-one units of platelet concentrates (PCs) were prepared from Iranian Blood Transfusion Organization and each unit was divided into three portions. In glycosylation UDP-galactose was injected to one of the portions. The bags were kept in different temperatures (22°C or 4°C). The parameters of platelet counts, aggregation and the binding capacity of macrophages (THP1 cell line) to platelets and their ingestion were studied. Data was analyzed using the Wilcoxon test.

Results: The results showed that platelet counts and function remained almost stable in refrigerated platelets. Galactosylation and storage of PC in cold temperature led to a better response of platelets to agonists in the aggregation test but it could not prevent their subsequent ingestion and phagocytosis by THP1 monocytic cell line.

Conclusion: Galactosylation and cold storage of platelets did not affect their phagocytosis by THP1cells. Because of the good maintenance of platelet count and function during storage of PC in cold, cold storage of PC could be an interesting area of research in future.

Keywords: Platelet concentrate, glycosylation, phagocytosis

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(115): 72-80 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۵ مرداد سال ۱۳۹۳ (۸۰-۷۲)

تاثیر گلیکوزیلاسیون برعملکرد و فاگوسیتوز پلاکت ها در طول نگهداری فرآورده پلاکت کنسانتره در سرما

میترا اسلام دوست[۱]
فاطمه یاری[۲]
مهین نیکوگفتار[۳]
مینو احمدی نژاد[۳]
محمد رضا طباطبایی[۱]
راضیه فدایی[۱]

چکیده

سابقه و هدف: سرما سبب تجمع گیرنده gpIbα بر سطح پلاکت می‌شود و به دنبال آن گیرنده‌های αMβ2 بر روی ماکروفاژهای کبدی، مولکول‌های gpIbα تجمع یافته را شناسایی کرده و پلاکت‌ها را می‌بلعند. به نظر می‌رسد، پوشاندن گروه‌های قندی مولکول gpIbα با قند گالاکتوز، بتواند از اتصال و فاگوسیتوز پلاکت توسط ماکروفاژ جلوگیری کند؛ بنابراین هدف از انجام این مطالعه تاثیر گلیکوزیلاسیون برعملکرد و فاگوسیتوز پلاکت‌ها در طول نگهداری فرآورده پلاکت کنسانتره در سرما می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در سال ۹۱ انجام شد، ۲۱ کیسه پلاکت کنسانتره از سازمان انتقال خون ایران تهیه و هرکیسه به سه قسمت تقسیم گردید. برای انجام گلیکوزیلاسیون به یکی از کیسه‌ها، محلول استوک UDP-Gal تزریق شد. کیسه‌ها در دماهای مختلف قرار داده شده و در روزهای مختلف،پارامترهای شمارش سلولی، اگرگیشن پلاکتیو میزان بلع پلاکت‌ها توسط ماکروفاژها (سوش سلولی THP1) بررسی گردید. در نهایت داده‌های به دست آمده به وسیله آزمون غیر پارامتریک (Wilcoxon) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که شمارش و عملکرد پلاکتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، تقریباً ثابت می‌ماند. گالاکتوزیلاسیون و نگهداری در سرما سبب پاسخ بهتر پلاکت‌ها به اگونیست‌ها در تست آگریگاسیون شده اما نمی‌توانداز بلع و فاگوسیتوز پلاکت‌ها توسط سوش سلولی THP1 جلوگیری نماید.

استنتاج: انجام گالاکتوزیلاسیون و نگهداری پلاکت‌ها در سرما در فاگوسیتوز آن‌ها توسط سلول‌های THP1 تاثیر ندارد. به دلیل نگهداری خوب شمارش و عملکرد پلاکت درطول زمان ذخیره در۴ درجه سانتی‌گراد، مطالعه ذخیره پلاکت کنسانتره در سرما می‌تواند در آینده مورد بررسی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پلاکت کنسانتره، گلیکوزیلاسیون، فاگوسیتوز

مقدمه

امروزه تزریق پلاکتی برای جلوگیری یا درمان خونریزی در بیماران ترومبوسیتوپنیو هم‌چنین بیماران دارای نقص در عملکرد پلاکت مانند افراد مبتلا به ضایعات انکولوژیک و هماتولوژیک، بیماران مبتلا به

مولف مسئول: فاطمه یاری – تهران: موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران E-mail: f.yari@ibto.ir
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. استادیار، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۸/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۴/۲۲

تروما، بیماران تحت عمل جراحی قلب، جراحی عمومی، پیوند بافت جامد و DIC[1] حاد استفاده می‌شود. از این رو به دلیل افزایش تعداد بیمارانی که تحت درمان سرکوب مغزاستخوان هستند، درخواست استفاده از پلاکت کنسانتره به طور چشمگیری بالا رفته است.

پس از آن که مشخص شد پلاکت‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر خلاف دیگر سلول‌ها و بافت‌های قابل پیوند، سرما را تحمل نمی‌کنند و اگر حتی در معرض مدت کوتاهی سرما قرار بگیرند، به سرعت از گردش خون گیرنده حذف می‌شوند، سرویس‌های انتقال خون ملزم شدند فرآورده پلاکتی را در دمای محیط (دمای ۲درجه سانتی‌گراد ±۲۲ درجه سانتی گرادضمن به هم زدن مداوم و ملایم) نگهداری کنند(۱). این دما علاوه بر ایجاد شرایط مناسب برای رشد باکتری‌ها، سبب می‌شود پلاکت‌ها به طور متابولیکی فعال شوند(۲). بر این اساس در حال حاضر پلاکت کنسانتره فقط به مدت ۵-۳ روزدر دمای ۲۲ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود. این زمان کوتاه سبب محدودیت ذخیره پلاکتی در موارد نیازهای بالینی شده و موجودی فرآورده پلاکتی در دسترس را به شدت محدود می‌کند. از طرفی نگهداری فرآورده پلاکتی در سرما، خطر رشد باکترها را بسیار کاهش داده و امکاناتی را برای نگهداری طولانی مدت پلاکت‌ها فراهم می‌کند(۳)، ولی پلاکت‌ها را دچار آسیب‌های غیر قابل برگشت سلولی از جمله از دست دادن شکل دیسکوئیدی و حرکت چرخشی ناشی از انکسار نور (swirling)[2]، افزایش کلسیم سیتوزولی، عدم حساسیت به عوامل ممانعت‌کننده اگرگیشن (تجمع) و افزایش بیان سطحی P- سلکتین، تجمع گیرنده‌های GpIb، ظهور غشائی فسفولیپیدهای دارای بار منفی مانند فسفاتیدیل سرین می‌نماید(۵،۴). هم‌چنین پلاکت‌های نگهداری شده در سرما بیش‌تر از پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط، تجمع خود به خودی تشکیل می‌دهند(۶).

مجموع عوامل یاد شده، سبب می‌شوند پلاکت‌های نگهداری شده در سرما پس از تزریق به سرعت از گردش خون محو شوند(۷). ابتدا تصور می‌شد علت کلیرانس و پاک‌سازی سریع پلاکت‌ها بعد از تزریق، تغییر شکل آن‌ها می‌باشد، ولی با وجود تلاش موفقیت‌آمیز برای جلوگیری از تغییر شکل پلاکت‌ها در سرما با استفاده از اتیلن گلیکول تترا استیک اسید (EGTA) و سیتوکالاسین B (مهارکننده تجمع اکتین)، باز هم حذف و پاک سازی پلاکت‌های نگهداری شده دردمای ۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت صورت می‌گیرد(۸).

در سال‌های معلوم شده که حداقل بخشی از طول عمر پلاکت‌های تزریق شده بر مبنای مکانیسم‌های با واسطه گلیکان- لکتین تنظیم می‌شود(۹،۱۰). مکانیسم اصلی کلیرانس و پاک‌سازی پلاکت‌های سرما دیده ابتدا در موش مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که حذف پلاکت‌ها به واسطه یک جفت گیرنده- لیگاند صورت می‌گیرد(۶،۱۱). در پلاکت‌های موشی که به مدت ۴-۲ ساعت در معرض سرما قرار می‌گیرند، کمپلکس‌های گیرنده فاکتور فون ویلبراند (vWF-R) یعنی [$(GpIb\alpha/\beta/IX)_2V$] بر سطح پلاکت تجمع می‌یابند و به دنبال آن رزیدوهای بتا N-استیل گلوکزآمین (β-GlcNAC) روی گلیکان‌های N- لینک زیر واحد GpIbα به هم متصل می‌شوند. سپس جایگاه لکتینی گیرنده‌های اینتگرین αMβ2 که روی ماکروفاژهای کبدی قراردارند، مولکول‌های GpIbα تجمع یافته را شناسایی کرده و پلاکت‌ها را می‌بلعند(۶،۱۲). پیشنهاد شده است که پوشاندن رزیدوهای β-GlcNAC با گالاکتوز از اتصال و فاگوسیتوز پلاکت توسط ماکروفاژ جلوگیری می‌کند(۱۳،۱۱). تحقیقات نشان داده است که پلاکت‌های موشی که به مدت ۲ ساعت در دمای ۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با گالاکتوز دست کاری می‌شوند، پس از تزریق به موش طبیعی (wild type)

1. Disseminated intravascular coagulation
2. Platelet swirling is caused by light diffraction

گردش نرمال (طبیعی) دارند(۱۵،۱۴). گلیکوزیله نمودن پلاکت‌ها با انکوباسیون PRP [1] و سوبسترای گالاکتوز صورت می‌گیرد. آنزیم‌های گالاکتوزیل ترانسفراز که در جهت اتصال کووالانت گالاکتوز به βGlcNAc عمل می‌کنند، به طور طبیعی در پلاکت‌ها وجود دارند(۱۷،۱۶) بنابراین اگر مکانیسم کلیرانس و پاک‌سازی مشاهده شده در موش در انسان هم صادق باشد، تغییرات کربوهیدراتی پلاکت‌ها سبب دست‌یابی به روش‌های عملی برای ذخیره واحدهای پلاکتی در سرما می‌شود(۱۸،۱۵).

با توجه به گزارش‌های محدود، به دلیل فواید برای انجام روش گلیکوزیلاسیون از جمله افزایش زمان نگهداری پلاکت، تلاش شده است در شرایط بانک خون و بر روی فرآورده پلاکت کنسانتره، اثر گلیکوزیلاسیون مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۱ صورت گرفت، ۲۱ کیسه پلاکت کنسانتره تهیه شده به روش PRP، به شکل تصادفی و پس از کسب رضایت کتبی از اهداکنندگان خون مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون تهران تهیه گردید. به دلیل زمان لازم برای انجام آزمایشات غربالگری ویروسی روی فرآورده‌های خونی، واحدهای پلاکت کنسانتره ۲۴-۱۲ ساعت پس از زمان خون‌گیری از بخش فرآورده‌های خونی پایگاه تهران تحویل و به ستاد انتقال خون منتقل گردیدند.

برای تقسیم پلاکت کنسانتره در یک سیستم بسته، لازم بود از کیسه‌های جمع‌آوری خون (چهارتایی) که حاوی سه کیسه اقماری و یک کیسه حاوی ماده ضد انعقاد/ نگهدارنده (CPDA[2]) بود، استفاده شود. پس از تقسیم کیسه‌ها، کیسه اولیه به عنوان کیسه کنترل دمای محیط به انکوباتور پلاکت (دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد همراه با آژیتاسیون) منتقل شد (کیسه Control 22). به یکی از دو کیسه دیگر به عنوان کیسه پلاکت گلیکوزیله (کیسه Gal 4)، ۱ میلی لیتر محلول استوک UDP-Gal در شرایط استریل و در زیر هود کلاس II تزریق گردید (غلظت ۸۰۰ میکرومول از UDP-Gal پس از انجام مطالعات اولیه و به‌کارگیری غلظت‌های مختلف دیگر از UDP-Gal انتخاب گردید). سپس دو کیسه (کیسه بدون قند به عنوان کیسه کنترل با دمای۴ درجه سانتی‌گراد (Control 4) و کیسه قند دار) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با آژیتاسیون قرار گرفتند. پس از اتمام این مدت، دو کیسه به مدت ۵ دقیقه بدون آژیتاسیون در دمای محیط قرار گرفته و سپس هر دو کیسه (کیسه کنترل و کیسه تست) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بدون آژیتاسیون قرار داده شدند. بر اساس مطالعات مشابه، روزهای ۲، ۳ و ۵ برای نمونه‌برداری در این زمینه انتخاب شدند.

جهت انجام شمارش سلولی و بررسی اگرگیشن (تجمع) پلاکتی، رقیق‌سازی نمونه‌ها در لوله‌های جداگانه صورت گرفته وعملکرد پلاکتی با دستگاه اگریگومتر Helena-Packs-4 و Chrono-log700 و استفاده از آگونیست اسید آراشیدونیک و آگلوتینین ریستوستین مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین شمارش سلولی توسط دستگاه شمارش گر سلولی (Sysmex, Kobe, Japan) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

میزان‌فاگوسیتوز پلاکتی با استفاده ازسل لاین منوسیتی THP1([3])به روش فلوسیتومتری و به کارگیری از دستگاه Partec-pasIII بررسی شد. در مرحله اول برای آماده‌سازی سلول‌های THP1، پس از دریافت سوش سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، از طریق پاساژهای متوالی سلولی در محیط مغذی RPMI[4]، تعداد سلول کافی برای انجام آزمایش مربوطه فراهم گردید. بر اساس مطالعات منتشر شده که توسط Babic و همکاران

1. Platelet rich Plasma
2. Citrate phosphate dextrose adenine

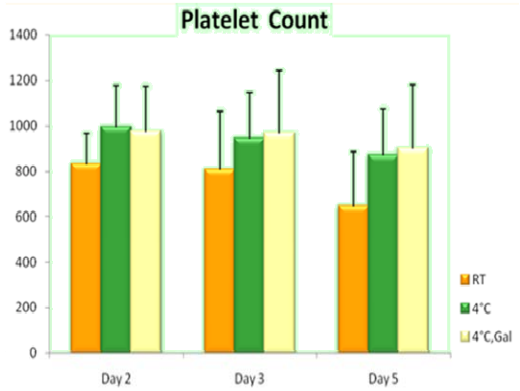
3 A human acute monocytic leukemia cell line
4. RPMI medium was developed at Roswell Park Memorial Institute, hence the acronym RPMI

در سال۲۰۰۷ صورت گرفت، تعداد سلول‌های THP1 برای مواجهه با پلاکت‌ها به ترتیبی تعیین شد که تعداد پلاکت‌ها ۵۰۰ برابر تعداد سلول‌های THP1 باشد. بر اساس شمارش سلولی، به‌طور معمول میانگین سلولی ۱۰۰ هزار سلول THP1 به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ای محیط کشت به تعداد نمونه‌های تست (چاهک حاوی پلاکت‌ها و سلول‌های THP1) و کنترل (چاهک حاوی فقط سلول‌های THP1) ریخته شد و با افزودن محیط مغذی RPMI حجم سلولی به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. از سوی دیگر برای فعال نمودن سلول‌های THP1، PMA در غلظت ۱۵۰mg/ml به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای افزوده گردید وپلیت به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور CO_2 قرار گرفت. برای تهیه پلاکت های نشاندار شده از مپاکرین (Sigma-Aldrich) استفاده شد. مپاکرین یکترکیب پلی‌فنولی است که نورهای منتشر شده از آن در طول موج ۵۱۹ نانومتر منتشر می‌شود و این طول موج در محدوده انتشار FITC [1] قرار دارد. پلاکت‌ها با استوک مپاکرین (در غلظت ۲۰mg/ml) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی انکوبه شدند؛ سپس برای حذف تداخل اثر اتوفلورسنس مپاکرین، سه بار شست و شو صورت گرفت. به منظور مواجهه پلاکت‌ها با سلول‌های THP1، پلاکت‌های نشاندار شده با مپاکرین، به سلول‌های THP1 فعال شده با PMA افزوده شدند و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور CO_2 قرار گرفت و پس از دو مرحله شست و شو برای حذف محیط RPMI، با افزودن تریپسین ۰/۰۵ درصد و یک مرحله شست و شو، آنتی‌بادی منوکلونال موشی علیه CD14 (IgG1) کونژوگه شده با رودامین (AbDSero Tec) اضافه گردید. در نهایت نمونه‌ها برای آنالیز توسط دستگاه فلوسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند. داده‌های به دست آمده به وسیله نرم‌افزار آماری SPSS (16) و آزمون غیر پارامتریک (Wilcoxon) مورد مقایسه قرار گرفت.

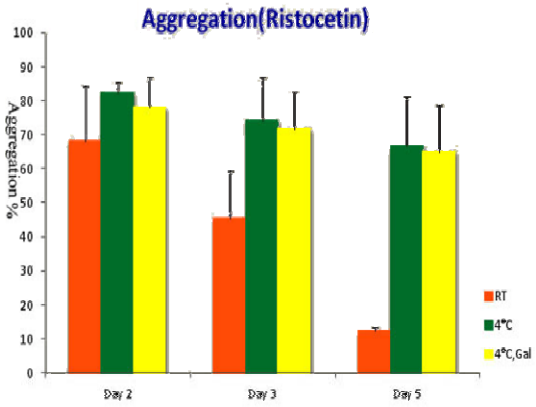
1. Fluorescein isothiocyanate

یافته ها

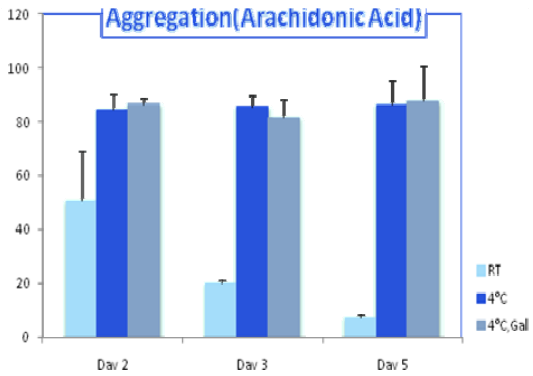
در روزهای ۲، ۳ و ۵ شمارش تعداد پلاکت‌ها در میکرولیتر ذخیره در پلاکت‌های گلیکوزیله، توسط دستگاه Sysmex انجام شد؛ در این شکل تعداد نشان داده شده در ضریب (10^3) ضرب می‌شود. همان‌گونه که در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌شود، شمارش پلاکتی در طول زمان ذخیره کاهش می‌یابد اما کاهش در پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط، بیش‌تر و در پلاکت‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، کم‌تر می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که شمارش پلاکتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، تقریباً محفوظ باقی می‌ماند و گالاکتوزیلاسیون در حفظ شمارش پلاکتی نقش چندانی ندارد. درصد آگریگاسیون و میزان عملکرد پلاکتی در روزهای ۲، ۳ و ۵ در پلاکت‌های گلیکوزیله در حضور آگونیست‌های اسید آراشیدونیک و ریستوستین مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در تصاویر شماره ۲و ۳ مشاهده می‌شود، میزان آگریگاسیون در پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط، در طول زمان ذخیره به شدت کاهش می‌یابد، در حالی‌که قابلیت عملکرد پلاکتی در طول زمان ذخیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، تقریباً پایدار باقی می‌ماند و گالاکتوزیلاسیون در حفظ عملکرد پلاکتی نقش چندانی ندارد. از طرفی با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری میزان فاگوسیتوز پلاکتی توسط سلول‌های THP1 در پلاکت‌های گلیکوزیله و غیرگلیکوزیله در روزهای ۲، ۳ و ۵ بررسی شد (تصویر شماره ۴). برای بررسی فاگوسیتوز، جمعیت سلولی R1، با استفاده از رنگ‌آمیزی دوگانه (پلاکت‌های نشاندار شده با مپاکرین که در محدوده طول موج انتشار FITC قرار دارد و anti-CD14 کونژوگه شده با رودامین) در نظر گرفته شد تا تمام حالات واکنش بین پلاکت و سلول THP1 در نظر گرفته شود.



تصویر شماره ۱: شمارش پلاکتی در طول زمان ذخیره پلاکت کنسانتره در شرایط دمای اتاق (RT)، ۴ درجه سانتی گراد و ۴ درجه سانتی گراد همراه با گلیکوزیلاسیون. لازم به ذکر است تعداد سلول های نشان داده شده در شکل درضریب ۱۰۳ ضرب می شوند.



تصویر شماره ۲: درصد آگریگاسیون و میزان عملکرد پلاکتی در حضور فعال کننده ریستوستین درطول زمان ذخیره پلاکت کنسانتره در شرایط دمای اتاق (RT)، ۴ درجه سانتی گراد و ۴ درجه سانتی گراد همراه با گلیکوزیلاسیون



تصویر شماره ۳: درصد آگریگاسیون و میزان عملکرد پلاکتی در حضور فعال کننده آراشیدونیک اسید در طول زمان ذخیره پلاکت کنسانتره در شرایط دمای اتاق (RT)، ۴ درجه سانتی گراد و ۴ درجه سانتی گراد همراه با گلیکوزیلاسیون

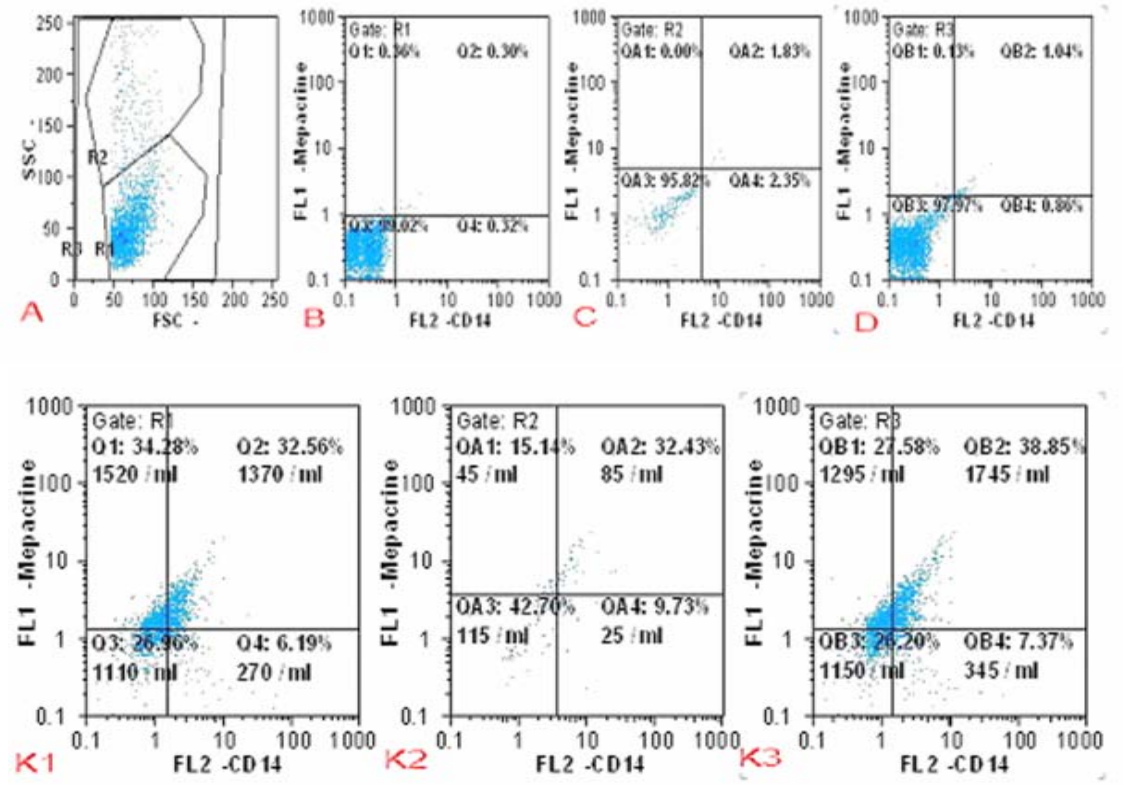
همان‌گونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، در جمعیت سلولی (R1) در طول زمان ذخیره احتمالا به دلیل بروز بیش‌تر رزیدوهای βGlcNAc و افزایش تجمع GPIbα در سطح پلاکت، میزان فاگوسیتوز پلاکت‌ها توسط سلول‌های THP1 افزایش می‌یابد و گالاکتوز اضافه شده نتوانسته است با پوشاندن این رزیدوها از فاگوسیتوز جلوگیری کند. علت کاهش بلع در روز ۵ ذخیره می‌تواند به دلیل افزایش ریزش GPIbα از سطح پلاکت‌ها باشد، اما میزان فاگوسیتوز در پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط به طور معناداری از دو حالت دیگر کم‌تر می‌باشد و در مقایسه با پلاکت‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد، نگهداری میزان فاگوسیتوز در پلاکت‌های گلیکوزیله و نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد (Gal4) در روز ۵، کم‌تر می‌باشد.

جدول شماره ۱: نتایج بررسی درصد فاگوسیتوز پلاکتی توسط سلول‌های THP1 در جمعیت R1 در روزهای ۲، ۳ و ۵ ذخیره پلاکت کنسانتره در پلاکت‌های ذخیره شده در شرایط مختلف با رنگ‌آمیزی دوگانه (مپاکرین و anti-CD14 کونژوگه شده با رودامین) و به کارگیری تکنیک فلوسیتومتری

فاگوسیتوز / پلاکتی در جمعیت R1	Mean ± SD روز ۲	روز۳	روز ۵
(۱) پلاکت های نگهداری شده در دمای محیط (Control 22)	۴۲/۳۷ ± ۱۵/۳۵	۶۳/۰۱ ± ۱۴/۲۲	۴۰/۷۰ ± ۱۲/۹۴
P value بین (۱) و (۲)	p= ۰/۵۱۴	p= ۰/۲۷۳	p= ۰/۰۴۳ *
(۲) پلاکت های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد (Control 4)	۴۰/۶۷ ± ۱۳/۲۸	۶۹/۳۵ ± ۷/۸۹	۴۹/۴۰ ± ۱۳/۳۷
P value بین (۱) و (۳)	p= ۰/۷۶۷	p= ۰/۱۹۲	p= ۰/۰۲۸ *
(۳)پلاکت‌های گلیکوزیله ونگهداری‌شده در دمای ۴ (Gal 4) درجه سانتی گراد	۴۱/۲۸ ± ۱۴/۸۳	۷۷/۵۸ ± ۴/۰۴	۴۶/۸۰ ± ۱۱/۲۴
P value بین (۲) و (۳)	p=۰/۵۱۵	p= ۰/۰۶۸	p= ۰/۴۲۷

* نتایج آزمون Nonparametric Test (Wilcoxon) در بررسی درصد فاگوسیتوز پلاکتی ارائه شده است.

– مقادیر ستاره دار (p<۰/۰۵) به منزله معنا دار بودن اختلافات می باشد.



تصویر شماره ۴: نمودارهای نتایج فلوسیتومتری بررسی میزان فاگوسیتوز پلاکتی در روز ۵ ذخیره پلاکت کنسانتره. (A)گیت جمعیت های سلولی، (B)، (C)، (D) هر یک،کنترل ایزوتیپ جمعیت های سلولی و نمودارهای (K1)، (K2)، (K3) میزان فاگوسیتوزپلاکتی در روز ۵ ذخیره پلاکت کنسانتره در پلاکت های نگهداری شده در دمای محیط در جمعیت های سلولی مورد نظر را نشان می دهند.

بحث

در این مطالعه، گالاکتوزیلاسیون دررابطه با فرآورده پلاکت کنسانتره انجام گردید و پس از نگهداری پلاکت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، عملکرد آن‌ها در in vitro مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که در زمان نگهداری پلاکت‌ها در سرما، شمارش پلاکتی نسبتاً ثابت باقی مانده و پاسخ پلاکت به آگونیست‌ها بهتر حفظ می‌شود. ضمن این که گالاکتوزیلاسیون و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سبب افزایش بقای پلاکت‌های نگهداری شده در سرما می‌شود (داده‌ها ارائه نشده است) اما از حذف و پاک سازی پلاکت‌های نگهداری شده به مدت طولانی، جلوگیری نمی‌کند.

دلیل اصلی که در حال حاضر فرآورده پلاکتی در دمای محیط نگهداری می‌شود، آن است که وقتی پلاکت در معرض سرما قرار می‌گیرد، نمی‌تواند در دوره زمانی قابل قبولی در خون فرد گیرنده جریان داشته باشد. در چند سال اخیر به منظور یافتن روشی برای نگهداری فرآورده پلاکتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پژوهش‌های زیادی صورت گرفته است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۳ توسط Hoffmeister و همکارانش انجام شد، از روش از گالاکتوزیلاسیون پلاکت‌های موشی استفاده گردید که در این روش از فاگوسیتوز پلاکت‌های موشی که به مدت کم‌تر از ۲ ساعت در دمای صفر درجه سانتی‌گراد قرار داده شده بودند، جلوگیری کرده و جریان خون آن‌ها را در in vivo افزایش می‌داد(۶).

در صورتی که ثابت شود، پلاکت‌های گالاکتوزیله و نگهداری شده در سرما عملکرد مؤثرتر و بقای طولانی‌تری نسبت به پلاکت‌های نگهداری شده در

دمای محیط دارند، می‌توان به فرآورده مناسب‌تر بالینی دست یافت. اکثر مطالعات in vitro نشان می‌دهند که بسیاری از خصوصیات پلاکت‌های نگهداری شده در سرما، بهتر و ایمن‌تر از پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط می‌باشد. از جمله مشاهده شده است که پلاکت‌های نگهداری شده در سرما نسبت به پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط در in vitro پاسخ اگرگیشن بهتری دارند(۱۵) که این یافته در مطالعه ما نیز نتیجه مشابهی نشان داد.

در یک بررسی in vitro که توسط Babic و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد، خصوصیات عملکردی پلاکت‌های گالاکتوزیله به مدت ۱۴ روز (در روزهای صفر، ۵ و ۱۴) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که در طول دوره ذخیره، توانایی پلاکت‌ها برای تجمع یافتن در مواجهه با آگونیست‌ها حفظ می‌شود، شمارش پلاکتی تا روز ۵ ذخیره تقریباً ثابت باقی می‌ماند و گالاکتوزیلاسیون روی شمارش پلاکتی اثری ندارد. نتایج بررسی میزان فاگوسیتوز در تحقیق انجام شده نشان داد که فاگوسیتوز پلاکت‌های گالاکتوزیله توسط سلول‌های منوسیتی THP1 تا روز ۵ ذخیره تقریباً ثابت می‌ماند و تا روز ۱۴ فقط کمی افزایش می‌یابد، در حالی که با افزایش زمان ذخیره، فاگوسیتوز در پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط و نگهداری شده در سرما افزایش می‌یابد(۱۱). نتایج متغیرهای اگرگیشن و شمارش پلاکتی این تحقیق، با مطالعه ما همخوانی وجود ندارد. همچنین در مورد نتایج فاگوسیتوز به دست آمده از تحقیق فوق تا روز ۵ ذخیره، با نتایج مطالعه ما، تا حدودی همخوانی مشاهده می‌شود. از آنجائی که در مطالعه Babic و همکاران بعد از روز صفر بلافاصله روز ۵ مورد بررسی قرار گرفته است، بنابراینبر این فاصله زمانی (روزهای ۲ و ۳) نتایج قابل مقایسه نمی‌باشند.

در مطالعه انجام شده توسط Wandall و همکاران که در سال ۲۰۰۸ انجام دادند، نتایج فاز یک آزمایشات بالینی پلاکت‌های آفرز اتولوگ منتشر شد که قبل از تزریق مجدد به اهداکننده‌های داوطلب به مدت ۴۸ ساعت در شرایط متفاوت نگهداری (پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط، پلاکت‌های نگهداری شده در سرما و پلاکت‌های گالاکتوزیله و نگهداری شده در سرما)، ذخیره شده بودند و به‌طور همزمان مطالعه مشابهی روی مدل موشی انجام شد. هدف اصلی این تحقیق ارزیابی اثر گالاکتوزیلاسیون پلاکتی در جلوگیری از حذف پلاکت‌های انسانی نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود که در راستای اثبات نتایج مطالعات موشی انجام گرفت. این مطالعه مشخص کرد که گالاکتوزیلاسیون از فاگوسیتوز پلاکت‌های موشی که به مدت کم‌تر از ۴ ساعت در دمای ۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند، جلوگیری می‌کند. با این حال، گالاکتوزیلاسیون از حذف پلاکت‌های موشی و انسانی که به مدت ۴۸ ساعت دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند، جلوگیری نمی‌کند و در بهبود بقای پلاکتی اثری نمی‌گذارد. این امر نشان می‌دهد که بارز شدن βGlcNAc در موش و انسان، تنها فاکتور تعیین‌کننده حذف پلاکت‌های نگهداری شده به مدت طولانی در سرما نمی‌باشد. از طرف دیگر خصوصیات اگرگیشن پلاکت‌های گالاکتوزیله و پلاکت‌های نگهداری شده در سرما حفظ می‌گردد و شمارش پلاکتی ثابت باقی می‌ماند(۱۳). این نتایج مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌باشد، به علاوه آن که در این مطالعه، گالاکتوزیلاسیون به عنوان پایدارکننده و نگهدارنده بقای پلاکت نیز عمل نمود.

در این مطالعه کاهش مشاهده شده در میزان بلع در روز ۵ ذخیره در مقایسه با روز ۳ می‌تواند به دلیل افزایش ریزش GPIbα از سطح پلاکت‌ها باشد که در شناسایی پلاکت‌ها توسط سلول‌های فاگوسیت تاثیر می‌گذارد. این در حالی است که میزان فاگوسیتوز در پلاکت‌های نگهداری شده در دمای محیط به طور معناداری از دو حالت دیگر کم‌تر می‌باشد. همه این

مشاهدات بیان‌گر این است که در زمان انکوباسیون پلاکت کنسانتره در بیش از ۴ ساعت (Wandall و همکاران در آن زمان کوتاه اثر مثبت گلیکوزیلاسیون را مشاهده نمودند)، گلیکوزیلاسیون پلاکت تاثیری در ممانعت از فاگوسیتوز پلاکتی نشان نمی‌دهد.

با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و مقایسه آن با سایر تحقیقات، به نظر می‌رسد که نگهداری پلاکت در سرما، سبب می‌شود شمارش پلاکتی در زمان ذخیره نسبتاً ثابت باقی مانده و پاسخ به آگونیست‌ها در آزمایش اگرگیشن (که برآورد خوبی از حفظ عملکرد پلاکت می‌باشد) بهتر حفظ شود.از طرفی گلیکوزیلاسیون و نگهداری در سرما، ضمن داشتن نتایج مشابه در خصوص شمارش و عملکرد پلاکتی، نتایج مطلوبی در خصوص میزان فاگوسیتوز پلاکتی ندارد. مطالعات بعدی در این خصوص، مستلزم انجام آزمایشات تکمیلی با به کارگیری سوش جدید سلول‌های منوسیت با منشاء کبدی می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد موسسه عالی طب انتقال خون می‌باشد. از موسسه عالی طب سازمان انتقال خون ایران به دلیل حمایت مالی و معنوی تشکر می گردد.

References

1. Kaufman RM. Uncommon cold: could 4degreeC storage improve platelet function? Transfusion 2005; 45(5): 1407-1412.
2. Leytin V, Allen DJ, Gwozdz A, Garvey B, Freedman J. Role of platelet surface glycoprotein Ibalpha and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. Transfusion 2004; 44(10): 1487-1495.
3. Snyder EL, Rinder HM. Platelet storage-time to come in from the cold? N Engle J Med 2003; 348(20): 2032-2033.
4. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology: in cold blood. Curr Biol 2003; 13(7): R282-284.
5. Hoffmeister KM, Falet H, Toker A, Barkalow KL, Stossel TP, Hartwig JH. Mechanisms of cold-induced platelet actin assembly. J Biol Chem 2001; 276(27): 24751-24759.
6. Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, Denis CV, Bergmeier W, Mayadas TN, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. Cell 2003; 112(1): 87-97.
7. Sorensen AL, Hoffmeister KM, Wandall HH. Glycans and glycosylation platelets: Current concepts and implications for transfusion. Curr Opin Hematol 2008; 15(6): 606-611.
8. Valeri CR, Ragno G, Marks PW, Kuter DJ, Rosenberg RD, Stossel TP. Effect of thrombopoietin alone and a combination of cytochalasin B and ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether) N, N'-tetraacetic acid-AM on the survival and function of autologous baboon platelets stored at 4 degrees C for as long as 5 days. Transfusion 2004; 44(6): 865-870.
9. Hoffmeister KM. The role of lectins and glycans in platelet clearance. J Thromb Haemost 2011; 9(Supp1): 35-43.
10. Josefsson EC, Gebhard HH, Stossel TP, Hartwig JH, Hoffmeister KM. The macrophage alphaMbeta2 integrin alphaM lectin domain mediates the phagocytosis of chilled platelets. J Biol Chem 2005; 280(18): 18025-18032.
11. Babic AM, Josefsson EC, Bergmeier W,

Wagner DD, Kaufman RM, Silberstein LE, et al. In vitro function and phagocytosis of galactosylated platelet concentrates after long-term refrigeration. Transfusion 2007; 47(3): 442-451.

12. Rumjantseva V, Grewal PK, Wandall HH, Josefsson EC, Sørensen AL, Larson G, et al. Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets. Nat Med 2009; 15(11): 1273-1280.
13. Wandall HH, Hoffmeister KM, Sørensen AL, Rumjantseva V, Clausen H, Hartwig JH, et al. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4 degrees C-stored platelets. Blood 2008; 111(6): 3249-3256.
14. Rumjantseva V1, Hoffmeister KM. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets.Transfus Apher Sci 2010; 42(1): 63-70.
15. Hoffmeister KM, Josefsson EC, Isaac NA, Clausen H, Hartwig JH, Stossel TP. Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. Science 2003; 301(5639): 1531-1534.
16. Van der wal DE, Verhoef S, Schutgens RE, Peters M, Wu Y, Akkerman JW. Role of glycoprotein Ibalpha mobility in platelet function. Thromb Haemost 2010; 103(5): 1033-1043.
17. Wandall HH, Rumjantseva V, Sørensen AL, Patel-Hett S, Josefsson EC, Bennett EP, et al. The origin and function of platelet glycosyltransferases. Blood 2012; 120(3): 626-635.
18. Badlou BA, Wu YP, Smid WM, Akkerman JW. Platelet binding and phagocytosis by macrophages. Transfusion 2006; 46(8): 1432-1443.