ORIGINAL ARTICLE

Effects of Platelet-derived Microparticles on the Respiratory Burst in Neutrophils

Effat Sabzikar[1],
Fatemeh Yari[2],
Mehran Ghasemzadeh[3]

[1] MSc in Hematology and Immunohematology, Iranian Blood Transfusion Organization, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Iranian Blood Transfusion Organization, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Iranian Blood Transfusion Organization, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

(Received April 4, 2015 ; Accepted August 12, 2015)

Abstract

Background and purpose: Platelet concentrates (PCs) are used in treatment of quantitative and qualitative platelet defects. In some cases it can cause complications in recipients. In PC, white blood cells, some mediators, cytokines and microparticles can contribute to adverse reactions in recipients. In this study, the effects of platelet-derived microparticles (PMP) were surveyed in the stimulation and activation of neutrophils.

Materials and methods: In this experimental study, PC units were prepared from Iranian Blood Transfusion Organization and sampling of the bags was carried out. PMPs were separated from PCs and treated with neutrophils. After the incubation time, the respiratory burst of neutrophils was evaluated by flow cytometry using Dihydrorhodamine 123. Finally, data was analyzed using the Wilcoxon non-parametric test.

Results: This study revealed that PMPs were able to stimulate and activate neutrophils ($P \leq 0.05$). This effect depended on the final concentration of PMPs. On the other hand, the expression of CD40L molecules on PMPs showed no significant differences in the studied days during storage.

Conclusion: According to this study PMPs in PC could play a role in activation of neutrophils.

Keywords: Platelet concentrate, neutrophil, microparticles, respiratory burst

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(128): 37-46 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۸ شهریور سال ۱۳۹۴ (۴۶-۳۷)

تاثیر میکروپارتیکل های پلاکتی در انفجار تنفسی در سلول‌های نوتروفیل

عفت سبزیکار[۱]
فاطمه یاری[۲]
مهران قاسم زاده[۳]

چکیده

سابقه و هدف: کنسانتره پلاکتی در درمان کمبود کیفی و کمی پلاکت استفاده می‌شود و در مواردی می‌تواند عوارضی در دریافت‌کنندگان فراورده ایجاد نماید. علاوه بر گلبول‌های سفید موجود در فرآورده پلاکتی، برخی مدیاتورها، سایتوکاین‌ها و نیز میکروپارتیکل‌های موجود در آن نیز می‌توانند واکنش ناخواسته در دریافت‌کنندگان ایجاد کنند. در این مطالعه نقش میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت در فرآورده پلاکتی در تحریک و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، کیسه‌های پلاکتی از پایگاه انتقال خون تهران تهیه و در روزهای ذخیره، از کیسه‌ها نمونه‌گیری به عمل آمد. از کنسانتره پلاکتی، میکروپارتیکل‌های پلاکتی جدا گردیده و با سلول‌های نوتروفیل مواجه شدند. بعد از طی زمان انکوباسیون، انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها با به کارگیری دی‌هیدرورودامین-۱۲۳ و استفاده از روش فلوسیتومتری ارزیابی شد و میزان فعالیت نوتروفیل با فعالیت پایه آن مقایسه شد. در نهایت نتایج به دست آمده با آزمون غیر پارامتریک Wilcoxon مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که میکروپارتیکل‌های پلاکتی قادر به تحریک و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها می‌باشند ($p < ۰/۰۵$). این اثر وابسته به غلظت میکروپارتیکل‌های پلاکتی می‌باشد. از طرفی، بررسی بیان ملکول CD40L بر سطح میکروپارتیکل‌های پلاکتی تفاوت معنی‌داری را در میزان بیان این ملکول در روزهای مطالعه نشان نداد.

استنتاج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که میکروپارتیکل‌های پلاکتی در کنسانتره پلاکتی در فعال‌سازی نوتروفیل‌ها نقش دارند.

واژه های کلیدی: کنسانتره پلاکتی، نوتروفیل، میکروپارتیکل‌ها، انفجار تنفسی

مقدمه

میکروپارتیکل‌های پلاکتی (PMP)، وزیکول‌های غشایی هستند که در طی فعال شدن پلاکت‌ها آزاد و بعضی ویژگی‌های آنتی‌ژنی پلاکت‌ها از جمله بیان GPIIb/IIIa و GPIb را نشان می‌دهند(۱). به علاوه گیرنده‌های اتصالی عملکردی مانند P-selectin در سطح خود دارند و در واقع سطح کاتالیتیکی تولید

مولف مسئول: فاطمه یاری- تهران: موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران Email: 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، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران، تهران، ایران
۳. استادیار، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۲/۲۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۵/۲۱

می‌کنند که انعقاد را تسریع می‌کند(۲). PMP در پلاسمای بیماران با افزایش پلاکت و بیماری‌های التهابی افزایش می‌یابد و در افزایش تجمع لکوسیت‌ها و اتصال سطح عروقی نقش دارد و نقش میکروپارتیکل در میان کنش لکوسیت- لکوسیت نشان داده شده است(۳). یافته‌ها بیانگر آن است که ۹۰-۷۰ درصد میکروپارتیکل‌های پلاسما مشتق از پلاکت‌های فعال شده بوده و هم‌چنین میکروپارتیکل‌های پلاکتی در طول ۵ روز زمان ذخیره سازی فرآورده پلاکتی افزایش می‌یابد. البته شمارش PMP در واحدهای فرآورده‌های پلاکت فرزیس متفاوت، متنوع است. شمارش متوسط میکروپارتیکل‌های پلاکتی در ۵-۳ روز ذخیره سازی فرآورده پلاکتی فرزیس به صورت معنی‌داری نسبت به روز اول ذخیره‌سازی افزایش می‌یابد(۴). CD40L پروتئین عبوری از غشا است و متعلق به خانواده نکروز دهنده توموری (TNF) است و به صورت عمده بر روی پلاکت و لنفوسیت‌های T یافت می‌شود(۵) و می‌تواند به صورت محلول یا غشایی بر روی PMP وجود داشته باشد(۶). در عین حال، ملکول CD40 بر روی سلول‌هایی مانند لنفوسیت‌های B، سلول‌های دندریتیک، لنفوسیت T، فیبروبلاست، ماست سل، نوتروفیل، اندوتلیال، مونوسیت، ماکروفاژ و پلاکت حضور داشته و می‌توانند به وسیله CD40L تحریک شوند(۲). CD40L نقش با اهمیتی در هموستاز و فعالیت پلاکت دارد و در استحکام لخته و در میان کنش پلاکت‌ها با سایر سلول‌ها و تنظیم منفی ملکول‌های میانجی مختلف موثر است. مطالعات متعددی نشان داده است که CD40L محلول نقش مهمی در واکنش پلاکت‌ها با سایر سلول‌ها مانند نوتروفیل، لنفوسیت و سلول‌های اندوتلیال دارد. نقش CD40L محلول در فعالیت وابسته به پلاکت نوتروفیل به عنوان یکی از مکانیسم آسیب ریوی مرتبط با انتقال خون مدنظر است(۲). لکوسیت‌های پلی مورفونوکلئار (PMN) در دفاع میزبان علیه پاتوژن ها نقش اساسی دارند. میان کنش نوتروفیل- پلاکت عمدتا از طریق P-selectin و β2 اینتگرین، β3 اینتگرین (CD11b/CD18,CD41/CD61) و میان کنش بین CD40 و CD40L صورت می‌گیرد(۷). حضور نوتروفیل، آزادسازی CD40L محلول ازپلاکت‌ها را تحریک می‌کند و منجر به افزایش تولید سوپراکسید و گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود. اختصاصیت مسیر CD40 – CD40L در واکنش پلاکت- نوتروفیل با استفاده از CD40L محلول نوترکیب و آنتی‌بادی ضد CD40L تایید شده است(۵). تزریق فرآورده پلاکتی در موارد زیر انجام می‌شود: بیمارانی که به علت ترومبوسیتوپنی، خونریزی دارند یا به صورت پیشگیرانه در بیماران با پیش‌بینی کاهش پلاکت برای مثال پس از شیمی درمانی یا پیوند مغز استخوان(۶). با وجود نقش حیاتی این فرآورده در افزایش طول عمر بیماران و بهبود وضعیت آن ها، شیوع عوارض ناشی از تزریق فرآورده پلاکتی حدود ۳۰ درصد است و به طرق مختلف از جمله تب (FNHTR)، آلرژی، TRALI و TACO بروز می‌یابد(۲). داده‌های قبلی نشان داده است که CD40L در پلاسما و فرآورده‌های خونی مانند خون کامل، گلبول قرمز فشرده و فرآورده پلاکتی حضور دارد و میزان CD40L محلول در فرآورده پلاکتی که به روش پلاکت فرزیس تهیه شده است، نسبت به سایر فرآورده‌ها بیش‌تر است(۸). البته میزان CD40L محلول در پلاسمای تازه منجمد (FFP)، ۵۰ برابر سایر محصولات دیگر است(۷). CD40L مشتق از پلاکت، فعال‌کننده بالقوه نوتروفیل است و ادم ریوی و فراخوانی نوتروفیل‌ها به وسیله سپسیس را میانجیگری می‌کند. طبق مطالعات انجام شده، مکانیسم فعال شدن نوتروفیل‌ها با واسطه تشکیل پروتئین التهابی ماکروفاژ ۲ (MIP2) و سیگنال رسانی به وسیله CXCR2 صورت می‌گیرد(۹).

در این مطالعه، میکروپارتیکل‌های پلاکتی در زمان ذخیره سازی پلاکت کنسانتره از آن به دست آمده و پس از سنجش سطح CD40L، اثر این میکروپارتیکل‌ها در تحریک و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها مورد سنجش و بررسی قرار گرفت. بررسی قابلیت میکروپارتیکل‌های

ذکر شده مربوط به روزهای مختلف ذخیره پلاکت کنسانتره در القای انفجار تنفسی در سلول‌های نوتروفیل به شیوه این مطالعه تاکنون انجام نشده است.

مواد و روش ها

تهیه میکروپارتیکل های پلاکتی

در این مطالعه تجربی، کیسه‌های کنسانتره پلاکتی در روز یک از پایگاه انتقال خون تهران تهیه و داخل شیکر- انکوباتور مخصوص کیسه‌های کنسانتره پلاکتی قرار گرفت. روز صفر نگهداری کنسانتره پلاکتی، روز خونگیری از اهداکننده و تهیه فرآورده بود. در روزهای ۲، ۳ و ۵ از کنسانتره ها در زیر هود کلاس II، نمونه‌برداری شده و در روزهای ۲ و ۳ بسته شده و دوباره به شیکر مخصوص منتقل شدند. لوله‌های محتوی کنسانتره پلاکتی ابتدا در دور ۲۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند تا پلاکت‌ها، گلبول‌های سفید و قرمز رسوب داده شوند. سپس سوپ رویی در دور g ۱۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب میکروپارتیکل‌ها دو بار با محلول PBS شستشو شدند.

بعد از خارج کردن محلول PBS، غلظت پروتئینی میکروپارتیکل‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ nm همراه با استانداردهای آلبومین گاوی اندازه‌گیری شد. جهت بررسی اندازه ذرات میکروپارتیکل از دستگاه Zetasizer Nano ZS Malvern در دانشکده داروسازی دانشگاه تهران استفاده شد. با تاباندن نور لیزر با طول موج ۶۳۳ نانومتر به محلول حاوی میکروپارتیکل‌ها در دستگاه مورد نظر، نورهای پراکنده شده از محلول شناسایی و اندازه ذرات توسط نرم افزار نصب شده در دستگاه محاسبه شد.

تعیین ویژگی میکروپارتیکل‌ها (اثبات انشقاق آن‌ها از پلاکت)

برای اثبات این که میکروپارتیکل‌های به دست آمده، میکروپارتیکل‌های پلاکتی هستند، یکی از آنتی‌ژن‌های اصلی پلاکت (CD41) بر سطح میکروپارتیکل‌ها بررسی شد. ۱۰۰ میکرولیتر از میکروپارتیکل‌های به دست آمده از کنسانتره پلاکتی داخل میکروتیوب ریخته شد و به آن ۲ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD41 کونژوگه با FITC (فلوئوروسین ایزوتیوسیانات) اضافه شد. میکروتیوب در یخچال به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس میکروپارتیکل در ۱ میلی‌لیتر نرمال سالین سوسپانسیون شده و لوله حاوی ایزوتیپ کنترل هم همراه شد و با دستگاه مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی سلول های نوتروفیل

جهت تهیه نوتروفیل‌ها از نمونه خون کامل استفاده شد و جهت جداسازی نوتروفیل‌ها از روش Boyum method با کمی تغییر به شرح زیر استفاده شد. ۳ ml خون کامل با ۵ ml دکستران مخلوط و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از طی انکوباسیون، سوپرناتانت به نسبت ۵ به ۳ روی فایکول اضافه شد و در ۲۵۰۰ rpm به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از این مدت محتوای محلول رویی خارج شد و رسوب باقیمانده با ۱۰ ml کلرید آمونیوم ۰/۰۸درصد به مدت ۳۰ دقیقه مواجه شد تا گلبول‌های قرمز باقیمانده لیز شوند. بعد از این مدت سلول‌ها به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ و سپس ۲ بار با محلول PBS، شسته شدند و در انتها ۱ میلی‌لیتر بافر هنکس به مخلوط اضافه شد و به وسیله لام نئوبار تعداد سلول‌ها شمرده شدند و درصد بقای آن‌ها با استفاده از تریپان بلو سنجیده شد. هم‌چنین از نوتروفیل‌های حاصله لام تهیه شد و به وسیله رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی صورت گرفته و در زیر میکروسکوپ نوری ارزیابی شد.

بررسی بیان CD40L بر روی میکروپارتیکل‌های پلاکتی

جهت بررسی بیان CD40L بر روی میکروپارتیکل‌های پلاکتی با استفاده از روش فلوسیتومتری غیر مستقیم، میکروپارتیکل‌های استخراج شده از پلاکت کنسانتره در روزهای ۲، ۳، ۵ نگهداری فرآورده پلاکتی،

ابتدا با anti-CD40L و سپس آنتی‌بادی لایه دوم (anti-mouse IgG) کونژوگه با ماده فلورسنت PE مواجه شده و در نهایت نتایج به وسیله دستگاه فلوسیتومتری آنالیز شد.

مواجهه نوتروفیل ها با میکروپارتیکل های پلاکتی

نوتروفیل‌های تخلیص شده با تعداد $۱-۲ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر در بافر هنکس به میزان ۱۰۰λ درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد. بعد از انجام آزمایش‌های مقدماتی با غلظت‌های مختلف میکروپارتیکل استخراجی از کیسه های پلاکتی دو غلظت ۵۰۰ µg/ml و ۱۰۰۰ µg/mlبه عنوان غلظت‌های ثابت جهت مواجهه با نوتروفیل‌ها مد نظر قرار گرفت و غلظت‌های سوسپانسیون میکروپارتیکل استخراجی از کیسه‌های پلاکتی جهت رسیدن به این دو غلظت تنظیم شد. بدین ترتیب محلول حاوی میکروپارتیکل‌ها به میزان ۱۰۰λ به ۱۰۰λ سوسپانسیون نوتروفیل ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همراه با این پروسه، کنترل‌ها شامل محتوی نوتروفیل – PBS و CD40L خالص شده– نوتروفیل نیز اعمال شد.

ارزیابی فعالیت نوتروفیل‌ها به وسیله DHR-123 (دی‌هیدرو رودامین -۱۲۳)

پس از مواجهه نوتروفیل‌ها با میکروپارتیکل‌ها، نمونه‌ها در دور ۲۵۰۰rpm، سانتریفوژ و محلول رویی خارج و ۱۰۰ میکرولیتر از DHR123 با غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و بعد از این مدت، نمونه‌ها با محلول PBS در دور ۲۵۰۰rpm شسته شده و در انتها ۱ ml سالین به آن‌ها اضافه شد و به وسیله دستگاه فلوسیتومتری در طول موج ۵۳۶nm–۵۲۰ سنجش شد. در نمونه‌های کنترل، میزان فلورسنس سلول‌های نوتروفیل همراه با PBS و در حالت دیگر همراه با DHR-123 بدون افزودن میکروپارتیکل‌ها به عنوان فعالیت پایه نوتروفیل محسوب شد.

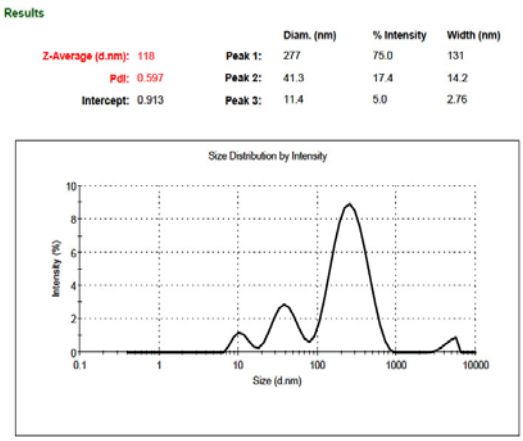
تحریک سلول های نوتروفیل

برای افزایش حساسیت روش DHR-123 از محلول LPS با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. این غلظت با استفاده از آزمایش‌های مقدماتی با غلظت‌های مختلف LPS به دست آمد و غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به عنوان غلظت مناسب که می‌توانست نوتروفیل‌ها به مقدار مناسب تحریک کند، انتخاب شد. هرچند با به کارگیری LPS آستانه فعالیت پایه نوتروفیل حتی در نمونه کنترل نیز بالاتر رفت، اما با این روش آستانه شناسایی و حساسیت روش افزایش یافت.

یافته ها

بررسی اندازه ذرات میکروپارتیکل

با استفاده از دستگاه Zetasizer با تاباندن نور لیزر با طول موج ۶۳۳ نانومتر به محلول حاوی میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت، در دستگاه Zetasizer Nano ZSMalvern نورهای پراکنده شده از محلول، شناسایی و اندازه میکروپارتیکل‌ها توسط نرم‌افزار نصب شده در دستگاه محاسبه شد. آنالیز نورهای پراکنده شده از محلول حاوی میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت نشان دهنده جداسازی میکروپارتیکل‌ها بدون آلودگی با پلاکت بود (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: نتایج حاصل از بررسی اندازه میکروپارتیکل پلاکتی با استفاده از دستگاه Zetasizer نشان دهنده اندازه مولکولی کوچک تر از ۱۰۰۰ نانومتر برای این میکروذرات می باشد

تعیین ویژگی میکروپارتیکل‌ها (اثبات انشقاق آن‌ها از پلاکت)

بررسی ویژگی میکروپارتیکل‌های تعیین سایز شده و جدا شده از فرآورده کنسانتره پلاکتی با استفاده از آنتی‌بادی علیه CD41 و کونژوگه با FITC با استفاده از روش فلوسیتومتری انجام شد. در این نمونه به عنوان مثال میزان بیان CD41 در سطح میکروپارتیکل‌های جدا شده در روز سوم ذخیره‌سازی کنسانتره پلاکتی ۶۸/۴۴ درصد بود.

بررسی بیان CD40L بر روی میکروپارتیکل های پلاکتی

درصد بیان ملکول CD40L بر روی میکروپارتیکل‌های پلاکتی در روزهای ۲،۳ و ۵ ذخیره پلاکتی به وسیله دستگاه فلوسیتومتری سنجش شد. با توجه به مقادیر به دست آمده و نتایج حاصل از آزمون غیرپارامتریک Wilcoxon test، درمیزان بیان ملکول CD40L در روزهای یاد شده تفاوت معنی‌داری با یکدیگر مشاهده نشد (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲).

شمارش و تعیین ویژگی نوتروفیل ها

بعد از جداسازی نوتروفیل‌ها و شمارش آن‌ها، درصد بقای (viability) آن‌ها با استفاده از تریپان بلو ۰/۴ درصد ۴ ±۸۰ درصد تعیین شد.

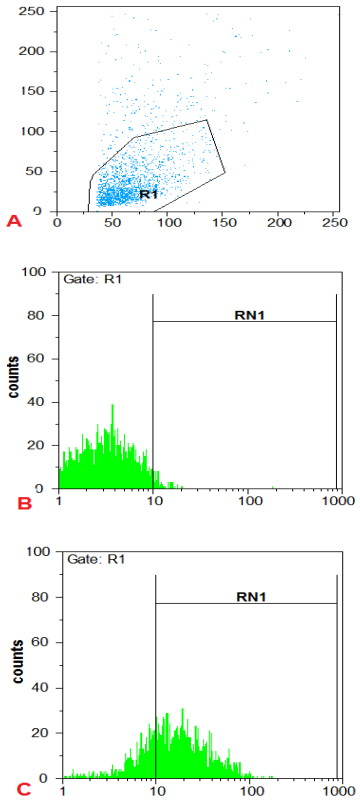
ارزیابی فعالیت نوتروفیل‌ها به وسیله DHR-123(دی هیدرو رودامین-۱۲۳)

بعد از مواجهه نوتروفیل‌ها با میکروپارتیکل پلاکتی در روزهای ۲، ۳ و ۵ ذخیره پلاکت کنسانتره، درصد انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها به وسیله DHR123 با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری ارزیابی شد. در ضمن از سوسپانسیون نوتروفیل در بافر PBS به عنوان کنترل منفی استفاده شد و درصد فعالیت نوتروفیل‌ها در مقایسه با این سوسپانسیون سنجش شد. سوسپانسیون حاوی میکروپارتیکل‌های حاصل از کنسانتره پلاکتی با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مورد سنجش قرار گرفت. غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر سوسپانسیون حاوی میکروپارتیکل پلاکتی قادر به فعال‌سازی نوتروفیل‌های بود($p=۰/۰۱$، $p=۰/۰۵$، $p=۰/۰۱$) (نمودارهای شماره۳و۴).

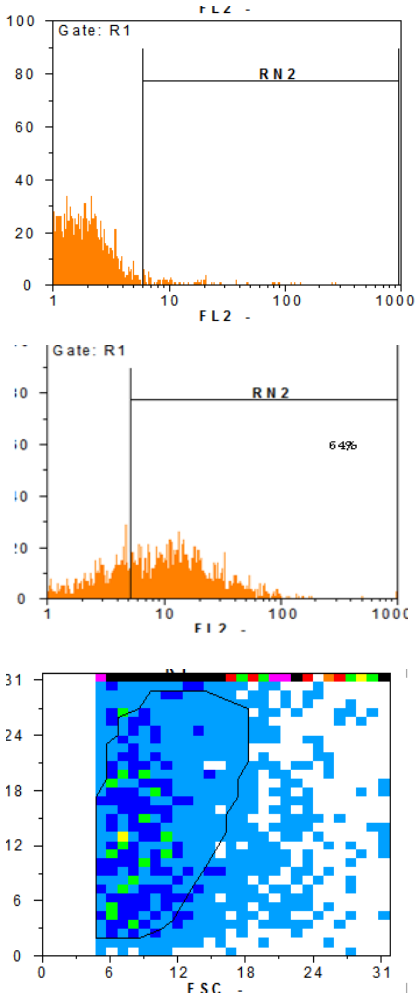
هم‌چنین غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی میکروپارتیکل پلاکتی قادر به فعال‌سازی نوتروفیل‌ها بود ($p_{day2}=۰/۰۴$، $p_{day5}=۰/۰۱$). به علت ایجاد پاره‌ای از مشکلات از جمله مشکل در ارسال آزمایش‌ها جهت فلوسیتومتری، داده‌های کافی برای روز ۳ در مواجهه نوتروفیل ها با میکروپارتیکل وجود نداشت (نمودار شماره ۴).

جدول شماره ۱: درصد بیان CD40L بر روی میکروپارتیکل های استخراج شده از کنسانتره پلاکتی در روز های ۲، ۳ و ۵ ذخیره پلاکت کنسانتره

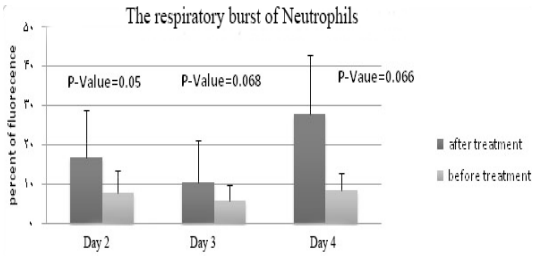
	روز ۲	روز ۳	روز ۵
کیسه پلاکت ۱	۶۱	۵۸	۸۱
کیسه پلاکت ۲	۴۱	۴۹	۸۳
کیسه پلاکت ۳	۷۰	۶۵	۸۵
SD	۱۴	۸	۲
Mean	۵۷	۵۷	۸۳



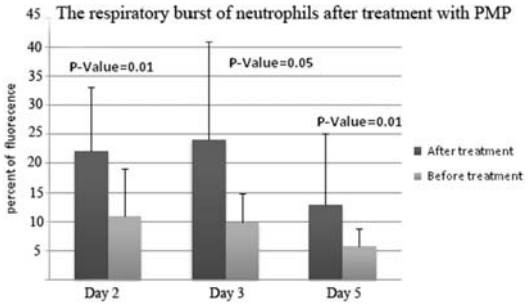
نمودار شماره ۲: نمودار نتایج فلوسیتومتری میزان بیان سطحی CD41 در سطح میکروپارتیکل‌های به دست آمده از کیسه‌های پلاکت کنسانتره. (A) گیت جمعیت میکروپارتیکل‌های پلاکتی، (B) کنترل ایزوتیپ FITC و (C) میزان بیان سطحی CD41 در میکروپارتیکل‌های جدا شده از کیسه‌های پلاکت کنسانتره را نشان می‌دهد



نمودار شماره ۳: بررسی بیان آنتی ژن CD40L بر سطح میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت. نمودار (A) گیت جمعیت میکروپارتیکل‌ها، نمودار (B) میزان بیان آنتی ژن CD40L بر سطح میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت در روز ۲ ذخیره سازی (بیان ۶۱ درصد) و نمودار (C) ایزوتیپ کنترل را نشان می دهند



نمودار شماره۴: مقایسه میانگین نتایج حاصل از انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها در سلول های نوتروفیل مواجه شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر میکروپارتیکل‌های پلاکتی به دست آمده از کنسانتره پلاکتی در روزهای ۲، ۳ و ۵ ذخیره در مقایسه با نوتروفیل مواجه شده با بافر با استفاده از ماده فلورسنس DHR-123 به وسیله روش فلوسیتومتری



نمودار شماره ۵: مقایسه میانگین‌نتایج حاصل از انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها در سلول‌های نوتروفیل مواجه شده با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از میکروپارتیکل‌های پلاکتی به دست آمده از کنسانتره پلاکتی در روزهای ۲ و ۵ ذخیره در مقایسه با نوتروفیل مواجه شده با بافر با استفاده از ماده فلورسنس DHR-123 به وسیله روش فلوسیتومتری

بحث

مطالعه ما به بررسی تاثیر میکروپارتیکل‌های به دست آمده از کنسانتره پلاکتی بر فعال‌سازی و انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها پرداخته است. میکروپارتیکل‌های پلاکتی وزیکول‌های غشایی هستند که درنتیجه فعالیت پلاکت‌ها آزاد می‌شوند(۳،۱). در این مطالعه، میکروپارتیکل‌های استخراجی از روزهای ۲، ۳ و ۵ نگهداری کنسانتره استخراج و با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر با نوتروفیل مواجه شد که قادر به فعال‌سازی و القای انفجار تنفسی در نوتروفیل‌ها بودند.

در این مطالعه جهت بررسی میزان فعالیت نوتروفیل، محصولات ROS حاصل از انفجار تنفسی با استفاده از ماده فلورسنس DHR-123 و روش فلوسیتومتری ارزیابی شد. در مقاله Xie و همکاران(۴) و Prior (۱۰) نیز از این روش استفاده شده است. در بیش‌تر مطالعات از محصولات حاصل از انفجار تنفسی جهت بررسی فعالیت نوتروفیل با روش‌های مختلف استفاده شده است از جمله Chakrabart و Kaen-baochen که جهت اندازه‌گیری مقدار ROS تولید شده از اکسیداسیون DCFH-DA استفاده نموده‌اند(۱۲،۱۱). بررسی میزان H_2O_2 ترشحی با روش‌های فلوسیتومتری یا الایزا نیز گزینه دیگری است که به وسیله آن‌ها فعالیت نوتروفیل‌ها قابل ارزیابی می‌باشد. به عنوان مثال Gorudko در سال ۲۰۱۴ و Vlaar

درسال ۲۰۱۰ از این روش استفاده کرده‌اند(۱۴،۱۳). مطالعه Vanichakarn و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان ترشح کموکاین یا مدیاتورها از نوتروفیل را شاخص اصلی فعالیت نوتروفیل در نظر گرفته است(۵). با توجه به مطالعات مختلف، به کارگیری DHR-123 در ارزیابی فعالیت نوتروفیل روش مناسب و در دسترس به شمار می‌آید(۱۰،۴).

Xie و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه in vitro نشان دادند که میکروپارتیکل‌های پلاکتی قادرند با اختلاف معنی‌داری نسبت به پلاسما، نوتروفیل‌های تحریک شده را فعال کنند و تخلیه میکروپارتیکل‌های پلاکتی در روز ۳ نگهداری پلاسمای کنسانتره پلاکتی باعث کاهش توانایی پلاسما در فعال‌سازی و تحریک نوتروفیل‌ها می‌شود. آن‌ها این نتیجه را به دست آوردند که CD40L که در سطح میکروپارتیکل‌های پلاکتی حضور دارد، قابلیت تحریک نوتروفیل‌ها را دارد(۴). مطالعه ما ضمن این که همسو با این گونه مطالعات است، یک مطالعه منحصر به فرد می‌باشد، زیرا میکروپارتیکل‌های پلاکتی به‌دست آمده از پلاکت کنسانتره در روزهای مختلف ذخیره را مورد استفاده قرار داده است. بیش‌تر مطالعات گذشته، به نقش CD40L محلول بر روی عملکرد سلول‌های مختلف از جمله نوتروفیل‌ها پرداخته است. از جمله Khan و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که CD40L نوترکیب با غلظت‌های 1ng/mL-5μg/mL باعث افزایش معنی‌داری در القای فعالیت اکسیداز نوتروفیل‌ها در مقایسه با نمونه کنترل (نوتروفیل و بافر) می‌شود. هم‌چنین در این تحقیق CD40L محلول در محیط کشت سوش سلولی HMVEC (به‌عنوان مدلی از TRALI) در حضور نوتروفیل تحریک شده باعث بروز آسیب اندوتلیال در مقایسه با گروه کنترل (HMVEC که با بافر PBS تیمار شده است) می‌گردد(۷). Vlaar و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ در مطالعه in vivo روی Rat، نشان دادند سوپرناتانت حاصل از فرآورده پلاکتی تازه حاصل از Rat به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (تزریق بافر به جای سوپرناتانت پلاکتی) باعث تحریک (priming) نوتروفیل‌ها می‌گردد. تزریق aged platelet باعث اتصال نوتروفیل‌ها روی دیواره اندوتلیال و ادم بافت ریه می‌شود. آن‌ها هیستوپاتولوژی بافت ریه Rat های تیمار شده با aged platelet را با هیستوپاتولوژی بافت ریه Rat با تزریق کنسانتره پلاکتی تازه و تزریق سالین در گروه کنترل مقایسه کردند و تفاوت معنی‌داری را در این دو گروه نشان دادند. بررسی ایمونوهیستوشیمی بیان CD40L در بافت ریه، تفاوتی را بین تزریق aged platelet و فرآورده تازه نشان نداد. سوپرناتانت حاصل از فرآورده پلاکتی تازه به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (تزریق بافر به جای سوپرناتانت پلاکتی) باعث تحریک (priming) نوتروفیل‌ها شده بود(۱۳). هم‌چنین بیان شده است که بروز TRALI به وسیله کنسانتره پلاکتی از فرآورده‌های دیگر بیش‌تر است و بروز عارضه با طول مدتی که از جراحی بیمار گذشته است، رابطه مستقیم دارد و در این رخداد نوتروفیل‌های فعال شده نقش دارند. در بعضی مطالعات سطوح افزایش یافته‌ای از ملکول CD40L محلول در TRALI (۷)، بیماری‌های سرطانی(۱۴) و بیماری‌های عروقی(۱۵) گزارش شده است. با وجود شواهدی در رابطه با نقش CD40L محلول در ایجاد TRALI، شواهدی نقیض این موضوع نیز وجود دارد، از جمله مطالعه Tuinman در سال ۲۰۱۱ که نقش CD40L را در ایجاد TRALI رد می کند(۱۶).

از طرف دیگر مطالعه ما نشان داد با افزایش مدت زمان نگهداری کنسانتره پلاکتی، توانایی میکروپارتیکل‌های استخراج شده در فعال‌سازی نوتروفیل‌ها کم‌تر می‌شود. به این ترتیب که میکروپارتیکل‌های استخراج شده از پلاکت کنسانتره در روزهای ۲ و ۳ نگهداری آن بیش‌تر از روز ۵ نگهداری قادر به فعال‌سازی نوتروفیل‌ها می‌باشند. از آن‌جایی که با افزایش مدت زمان نگهداری کنسانتره پلاکتی میزان توانایی آن‌ها در فعال‌سازی نوتروفیل‌ها کم‌تر شده است، نشان‌دهنده این است که با افزایش مدت نگهداری کیسه

پلاکتی، میکروپارتیکل‌های پلاکتی قابلیت کم‌تری در القای انفجار تنفسی در نوتروفیل‌ها دارند که می‌تواند بیانگر تغییر و آسیب وارد شده به پلاکت‌ها در طول زمان نگهداری (storage lesion) و به تبع آن تغییر در میکروپارتیکل‌های پلاکتی باشد. هم‌چنین، درمطالعه حاضر میزان بیان ملکول CD40L غشایی درسطح میکروپارتیکل‌ها در روزهای ۲، ۳ و ۵ تفاوت معنی‌داری نداشتند.

Xie و همکاران با استفاده از روش وسترن بلات نشان دادند که میزان CD40L در میکروپارتیکل‌های پلاکتی از روز ۳ به روز ۵ نگهداری کنسانتره پلاکتی افزایش معنی‌دار می‌یابد ($p < ۰/۰۵$) و این میکروپارتیکل‌ها قادر به تحریک نوتروفیل‌ها و القای انفجار تنفسی در آن ها می‌باشند(۴). مطالعه ما نیز با استفاده از روش فلوسیتومتری نشان داد، هر چند مقدار CD40L بیان شده در سطح میکروپارتیکل‌های پلاکتی در روز ۵ نسبت به روز ۳ افزایش داشته، ولی این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد. از سوی دیگر نتیجه مطالعه ما نشان داد که با افزایش زمان نگهداری کنسانتره پلاکتی، قدرت میکروپارتیکل‌ها در فعال سازی نوتروفیل‌ها کم‌تر می‌شود، در حالی که بیان ملکول CD40L در سطح میکروپارتیکل‌ها تغییری نکرده یا بیش‌تر می‌گردد. این موضوع نشان‌دهنده این است که ملکول CD40L در سطح میکروپارتیکل پلاکتی در طی ۵ روز نگهداری پلاکت قدرت فعال‌سازی نوتروفیل‌ها را تا حدی از دست داده و یا این که سایر عوامل موجود در میکروپارتیکل پلاکتی در طی ۵ روز تغییر می‌یابد که آن عناصر در تحریک و فعال سازی نوتروفیل‌ها نقش دارند.

روی هم رفته به نظر می‌رسد توجه به میان کنش پلاکت- نوتروفیل هر چه بیش‌تر ارتباط هموستاز- التهاب را که قبلا مورد توجه قرار گرفته است(۱۷) روشن نماید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که در فرآورده پلاکت کنسانتره، میکروپارتیکل‌های پلاکتی قادر به تحریک و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها می‌باشند و الگوی تاثیر آن ها بر حسب روز نگهداری فرآورده و غلظت آن ها تغییر می‌کند.

سپاسگزاری

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

References

1. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. Crit Rev Oncol Hematol 1999; 30(2): 111-142.
2. Refaai MA, Phipps RP, Spinelli SL, Blumberg N. Platelet transfusions: impact on homeostasis, thrombosis, inflammation and clinical outcomes. Thromb Res 2011; 127(4): 287-291.
3. Forlow SB, MCEver RP, Nollert MU. Leukocyte – leukocyte interactions mediated by platelet microparticle under flow. Blood 2000; 95(4): 1317-1323.
4. Xie RF, Hu P, Li W, Ren YN, Yang J, Yang YM, et al. The effect of platelet-derived microparticles in stored apheresis platelet concentrates on polymorphonuclear leucocyte respiratory burst. Vox Sanguinis 2014; 106(3): 234-241.
5. Vanichakarn P, Blair P, Wu C, Freedman JE, Chakrabarti S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. Thromb Res 2008; 122(3): 346-358.
6. Sahler J, Spinelli S, Phipps R, Blumberg N. CD40 ligand (CD154) involvement in platelet transfusion reactions. Transfus Clin Biol 2012; 19(3): 98-103.
7. 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.

8. Urner M, Herrmann IK, Buddeberg F, Schuppli C, Roth Z'graggen B, Hasler M, et al. Effects of blood products on inflammatory response in endothelial cells in vitro. PLoS One 2012; 7(3): e33403.
9. Rahman M, Roller J, Zhang S, Syk I, Menger MD, Jeppsson B, et al. Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. Inflamm Res 2012; 61(6): 571-579.
10. Prior S, Gander B, Blarer N, Merkle HP, Subirá ML, Irache JM, et al. In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly (lactide) and poly (lactide-co-glycolide) microspheres. Eur J Pharm Sci 2002; 15(2): 197-207.
11. Chen KB, Chang SS, Tseng YL, Chiu TH, Liao CC, Ho M, et al. Amniotic fluid induces platelet-neutrophil aggregation and neutrophil activation. Am J Obstet Gynecol 2013; 208(4): 318.e1-7.
12. Chakrabarti S, Rizvi M, Morin K, Garg R, Freedman JE. The role of CD40L and VEGF in the modulation of angiogenesis and inflammation. Vascular Pharmacol 2010; 53(3-4): 130-137.
13. Vlaar AP, Hofstra JJ, Kulik W, van Lenthe H, Nieuwland R, Schultz MJ, et al. Supernatant of stored platelets causes lung inflammation and coagulopathy in a novel in vivo transfusion model. Blood 2010; 116(8): 1360-1368.
14. Gorudko IV, Grigorieva DV, Shamova EV, Kostevich VA, Sokolov AV, Mikhalchik EV,et al. Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change. Free Radic Biol Med 2014; 68: 326-334.
15. Huang J, Jochems C, Talaie T, Anderson A, Jales A, Tsang KY, et al. Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role. Blood 2012; 120(15): 3030-3038.
16. Hassan GS, Merhi Y, Mourad W. CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases. Immunobiology 2012; 217(5): 521-532.
17. Zhang S, Rahman M, Zhang S, Qi Z, Thorlacius H. Simvastatin antagonizes CD40L secretion, CXC chemokine formation, and pulmonary infiltration of neutrophils in abdominal sepsis. J Leukoc Biol 2011; 89(5): 735-742.
18. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, ley K. Platelet-Neutrophil intractions: linking homeostasis and inflammation. Blood Reviews 2007; 21(2): 99-111.