ORIGINAL ARTICLE

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

Maryam Jahromi[1],
Fatemeh Yari[2],
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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۳ بهمن سال ۱۳۹۴ (۲۷۶-۲۶۷)

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[۱و۳]

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 منشا 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، نمونه‌برداری 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 $p<۰/۰۵$ 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 ($p< ۰/۰۵$).

استنتاج: میکروذرات مشتق از پلاکت قابلیت القای تولید آنتی‌بادی از کلاس IgG را از سلول‌های B دارند.

واژه های کلیدی: میکروذرات پلاکتی، سلولB، IgG

مقدمه

پلاکت‌ها قطعات سلولی بدون هسته مشتق از مگاکاریوسیت‌ها هستند که شناخته‌شده‌ترین نقش آن‌ها شرکت در انعقاد می‌باشد(۳-۱). 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 آداپتیو) نیز شرکت دارند(۶-۴). فعالیت پلاکت‌ها در ایمنی ذاتی به طور گسترده از طریق توانایی آن‌ها در آزادسازی مدیاتورهای التهابی بعد از فعال‌شدن 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،

مولف مسئول: فاطمه یاری: تهران: بزرگراه شیخ فضل الله نوری، تقاطع بزرگراه شهید همت، سازمان انتقال خون ایران، ستاد مرکزی 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. دانشجوی دکترای 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

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 فعال‌شده و مدیاتورهایی آزاد می‌کنندکه 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 آن جا که تعداد پلاکت‌ها در خون محیطی زیاد است، عمده CD40L محلول در پلاسما از پلاکت ها 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 آزادشدن 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 سایتوتوکسیسیتی 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(۱۴،۱۳). 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 اتوایمیون، التهابی، آترواسکلروزیس و بدخیمی‌ها با افزایش قابل توجه میکروذرات گردشی همراه می باشند(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، فراوان ترین (تقریباً ۹۰-۷۰ درصد) میکروذرات در گردش خون هستند(۱۵) و در تعدیل عملکردهای کلیدی شامل التهاب، هموستاز و آنژیوژنز نقش دارند(۱۸،۱۷). این میکروذرات در فراورده‌های 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 کنسانتره های 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

روشن شدن عملکرد ایمونولوژیک پلاکت‌ها در بدن بسیار کمک‌کننده باشد.

مواد و روش ها

درابتدا ۵کیسه پلاکت کنسانتره مربوط به هر یک از روزهای مختلف ذخیره‌سازی (روز دوم، سوم و پنجم ذخیره سازی) و فراورده خون تازه (کم‌تر از سه روز) از پایگاه انتقال خون منطقه‌ای و آموزشی استان تهران تهیه گردید. انتخاب کیسه‌ها به طور تصادفی صورت گرفت و در مورد گروه خونی، حجم و شکل ظاهری کیسه‌ها 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 سلول‌ها از قبیل گلبول‌های قرمز، سفید و پلاکت‌ها، 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 کیسه‌های پلاکتی سنجیده شد. هم‌چنین با استفاده از دستگاه Malvern Zetasizer Nano ZS و با تاباندن نور لیزر با طول موج ۶۳۳ nm 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 درسطح میکروذرات پلاکتی

جهت بررسی بیان مولکول CD40L در سطح میکروذرات پلاکتی حاصل از کیسه‌های پلاکتی، از روش فلوسیتومتری استفاده شد. در لوله میکروتیوب در حجم واکنشی ۱۰۰ میکرولیتر به سوسپانسیون حاوی میکروذرات پلاکتی، ۱ میکرولیتر از آنتی‌بادی (Abcam, Cambridge, USAAnti- CD40L) اضافه گردید. پس از انکوباسیون به مدت ۳۵ دقیقه در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی، نمونه‌ها دو بار با PBS شستشو و سانتریفوژ با دورg ۱۵۶۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. سپس به محلول باقی مانده از مرحله قبل، ۱ میکرولیتر از anti-mouse Ig کونژوگه با FITC اضافه شد. نمونه‌ها برای ۳۵ دقیقه در یخچال و در تاریکی انکوبه گردید. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، نمونه‌ها با دستگاه فلوسیتومتری از نظر بیان CD40L بررسی شدند. جهت اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها از ایزوتیپ کنترل استفاده شد.

جداسازی و تهیه سلول های B

برای جداسازی سلول‌های B از خون کامل، ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با به کارگیری محلول فایکول (Lymphodex, Innotrain, Germany) از بقیه سلول‌ها جدا شدند. سپس با استفاده از روش انتخاب منفی و با به کار بردن آنتی‌بادی‌های اختصاصی و به کارگیری ذرات مغناطیسی، جداسازی و تخلیص سلول‌های B از سایر سلول ها انجام شد.

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

۲ میکرولیتر Anti CD16، ۴ میکرولیتر Anti CD14 و ۵ میکرولیتر Anti CD3 به لوله فالکون 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 ۲۵۰۰rpm 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 فالکون حاوی سوسپانسیون سلولی در میدان مغناطیسی قرار داده شد تا بیدهای مغناطیسی که به سلول های واجد آنتی‌بادی متصل هستند، به دیواره لوله فالکون جذب شوند. سوسپانسیون باقی مانده در لوله فالکون عمدتاً دارای لنفوسیت‌های 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 لنفوسیت 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 سلول های 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.

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 میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌های P&S (حاوی ۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰ میلی گرم استرپتومایسین) استفاده گردید. تعداد لنفوسیت‌های B (۲×۱۰^{۵}در میلی‌لیتر)، غلظت میکروذرات (غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، 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 ۱۰۰۰-۵۰ میگروگرم در میلی‌لیتر انتخاب گردیدند. در چاهک‌های مختلف تست به ترتیب میکروذرات به دست آمده از کیسه‌های پلاکتی دو، سه و پنج روزه به همراه لنفوسیت B اضافه گردید. در چاهک های کنترل فقط سلول B به محیط کشت اضافه شد. در پایان این مرحله کار، پلیت در انکوباتور ۳۷°C، CO2 دار برای مدت ۵ روز نگهداری گردید. در روزهای دوم، سوم و پنجم کشت، نمونه‌برداری 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

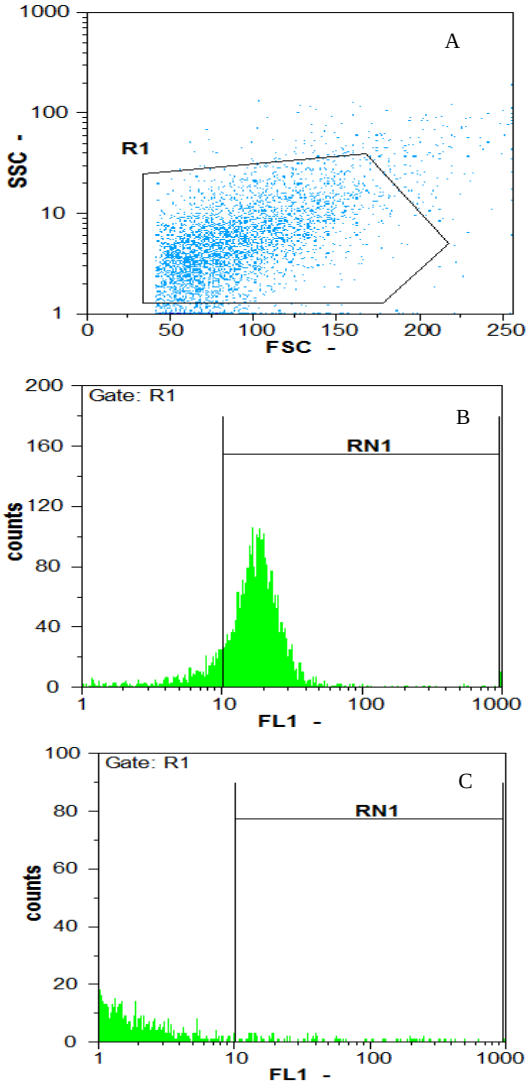
داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS (نگارش ۲۲) و آزمون آماری paired samples T-Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

یافته ها

بررسی بیان CD40L بر روی میکروذرات پلاکتی

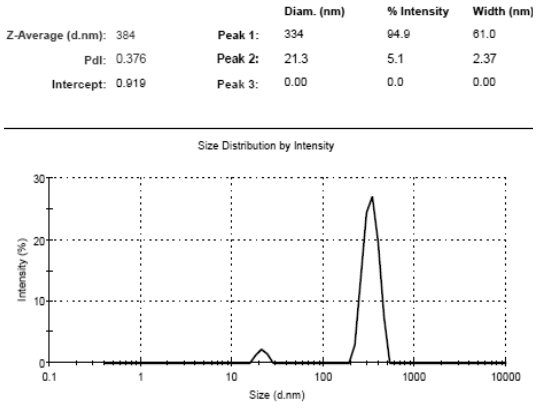
بررسی‌ها نشان داد که شاخص CD40L در سطح میکروذرات مشتق از پلاکت بیان می گردد؛ به این دلیل که پلاکت‌ها، CD40L را در سطح خود بیان می کنند و میکروذرات پلاکتی هنگام شکل گیری از غشای پلاکت این شاخص را نیز بر سطح خود حمل می کنند. میزان بیان این شاخص در سطح میکروذرات حاصل از کنسانتره پلاکتی سه روزه حدود ۶۱ تا ۸۱ درصد تعیین شد (میانگین ۱۰±۷۱ درصد) (تصویر شماره ۱).



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

تعیین سایز مولکولی میکروذرات پلاکتی

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌نمایید، ۲ پیک اصلی که تقریباً کل (۱۰۰ درصد) جمعیت هتروژن میکروزیکول‌های مشتق از سلول را نشان می‌دهند، با اندازه‌های مولکولی ۳۳۴ و ۲۱/۳ قابل مشاهده هستند که همگی بیانگر اندازه مولکولی کم‌تر از ۱۰۰۰ نانومتر آن ها است و پیک اصلی بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر قرار دارد.



تصویر شماره ۲: نمودار مرتبط با اندازه میکروزیکول‌های 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 سلول‌های B پس از بررسی نمونه حاوی لنفوسیت B با استفاده از فلوسیتومتری، ۴±۶۶ 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 آنتی‌بادی IgG در نمونه‌های تست و کنترل، با استفاده از روش الیزا مشخص شد که در نمونه‌های تست (سلول‌های B مواجهه شده با میکروذرات پلاکتی) نسبت به کنترل (سلول‌های B بدون میکروذرات)، میانگین غلظت آنتی‌بادی IgG در سوپ رویی محیط کشت در همه روزهای مواجهه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

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($p<0/05$). درحالی‌که 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 آنتی بادی IgG در نمونه های تست و کنترل در روزهای مختلف کشت پس از مواجهه (غلظت ۱۰۰µg/mL میکروپارتیکل های پلاکتی)

نمونه های تست (sample numbers =۵)	روز دوم کشت	روزسوم کشت	روز پنجم کشت
میکروپارتیکل دو روزه + سلول B (MP2-B)	۴۴±۱۴۱	۹۳±۴۶۴	۳۲±۱۱۸
p (مقایسه نسبت به کنترل)	۰/۰۴	۰/۰۰۱	>۰/۰۵
میکروپارتیکل سه روزه + سلول B (MP3-B)	۳۴±۱۳۳	۱۰۶±۵۱۸	۲۶±۱۲۴
p (مقایسه نسبت به کنترل)	۰/۰۳	۰/۰۰۲	>۰/۰۵
میکروپارتیکل پنج روزه + سلول B (MP5-B)	۸۱±۱۶۹	۳۳±۴۸۷	۸۲±۱۴۶
p (مقایسه نسبت به کنترل)	>۰/۰۵	۰/۰۰۱	>۰/۰۵
سلول B بدون میکروپارتیکل/ کنترل	۲۱±۱۰۶	۳۱±۱۳۰	۲۴±۱۲۴

- اعداد ذکر شده غلظت آنتی‌بادی بر اساس نانوگرم در میلی لیتر است (SD± میانگین).
- میانگین تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های تست در همه روزهای کشت بیش‌تر از کنترل است.

MP2-B (سلولB 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 میلی لیتر) 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 میانگین تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های تست بین غلظت ۱۰۰ با ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میکروپارتیکل پلاکتی اختلاف معنی‌داری وجود دارد($p<0/05$)(جدول شماره۲). 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 میلی لیتر است (SD± میانگین).
- میانگین تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های تست در همه روزهای کشت بیش‌تر از کنترل است.

MP2-B (سلولB 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 آنتی بادی IgG در نمونه های تست و کنترل در غلظت های مختلف میکروپارتیکل

نمونه های تست (sample numbers =۵)	غلظت آنتی بادی در حضور ۱۰۰ µg/mL از میکروپارتیکل	غلظت آنتی بادی در حضور ۵۰۰µg/mL از میکروپارتیکل
میکروپارتیکل دو روزه+سلولB(MP2-B)	۲۰±۴۱۳	۱۱۰±۴۷
میکروپارتیکل سه روزه+سلولB(MP3-B)	۳۵±۵۴۰	۵۹±۱۴۵
میکروپارتیکل پنج روزه+سلولB(MP5-B)	۳۲±۴۸۶	۶۰±۱۲۹
سلولB بدون میکروپارتیکل/کنترل	۱۲۱ ±۳۹	۳۹±۱۲۱

اعداد نوشته شده غلظت آنتی‌بادی بر اساس نانوگرم در میلی لیتر است (SD± میانگین).

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

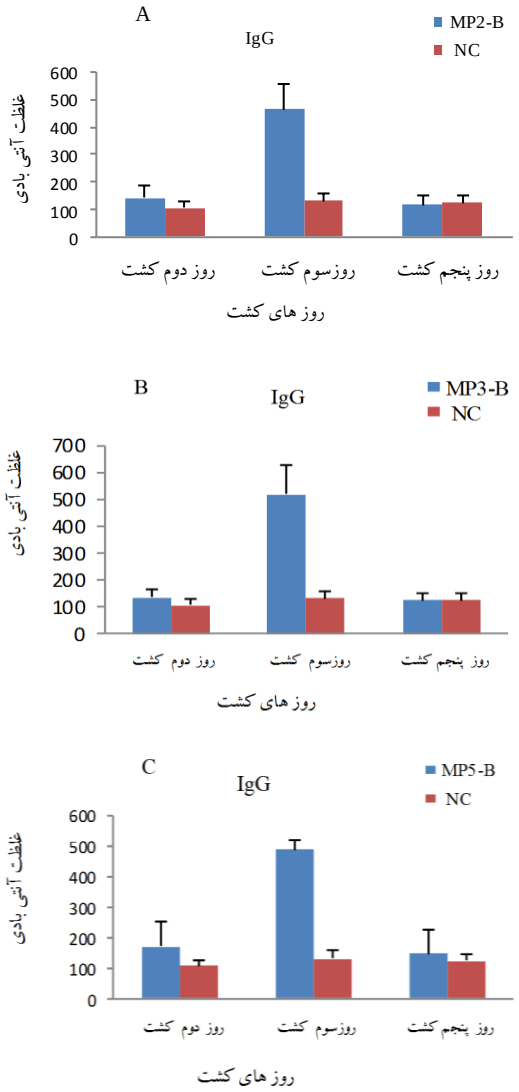
نمودارهای ستونی مقایسه‌ای مربوط به میزان تولید آنتی‌بادی IgG در نمونه‌های مختلف تست و کنترل در غلظت میکروپارتیکلی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و در روزهای مختلف کشت درتصویرشماره۳ آورده شده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

بحث

در این مطالعه سعی بر آن شد تا تاثیر میکروذرات مشتق از پلاکت بر تولید آنتی‌بادی از سلول‌های B بررسی گردد. اساس کار بر مطالعاتی بود که توسط فابریس کاگناس (Fabrice Cognasse) و همکارانش در سال 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 پلاکت‌ها با سلول‌های B در محیط آزمایشگاه (in vitro)، این دو سلول می‌توانند همدیگر را فعال کنند. به گونه‌ای که بیان شاخص‌های فعال‌سازی CD62P در سطح پلاکت‌ها و CD86 در سطح سلول‌های B افزایش می‌یابد. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که انکوباسیون سه روزه پلاکت‌ها با سلول‌های B باعث افزایش تولید آنتی‌بادی‌های IgM و IgG می‌شود(۹). هر چند این پژوهش‌ها بر روی میکروذرات مشتق از پلاکت انجام نشده بودند، نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که همانند پلاکت‌ها، مواجهه میکروذرات مشتق از پلاکت با لنفوسیت‌های B نیز باعث افزایش تولید آنتی‌بادی IgG می‌گردد و در این خصوص غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موثرتر می‌باشد.

Sprague ضمن اشاره به تاثیر پلاکت‌ها بر تولید آنتی‌بادی، برای اولین بار به بررسی نقش میکرووزیکول‌های پلاکتی بر فعالیت سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی و تشکیل مراکز زایا پرداخت. Sprague و همکارانش با آزمایش پلاکت و وزیکول‌های غشایی مشتق از پلاکت (PDMVs) روی موش‌های CD40L-/- اثبات کردند که این وزیکول‌های غشایی به واسطه انتقال سیگنال CD40L، باعث تولید آنتی‌بادی و شکل‌گیری مراکز زایا در موش (in vivo) می‌شوند. Sprague هم‌چنین در راستای بررسی نقش مرکزی CD40L در میانکنش پلاکت‌ها یا میکرووزیکول‌های مشتق از پلاکت با سلول‌های B، مشاهده کرد که بعد از اضافه کردن آنتی‌بادی ضد CD40L به میکرووزیکول‌ها قبل از تزریق به موش، تولید آنتی‌بادی کاهش می‌یابد. در مطالعه Sprague به منظور تعیین بر همکنش میکرووزیکول‌های مشتق از پلاکت و لنفوسیت‌های B، وزیکول‌های غشایی مشتق از پلاکت در in vitro با لنفوسیت‌های B کشت و مشخص شد که تکثیر



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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

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 لنفوسیت های B صورت نمی‌گیرد(۲۱). نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات قبلی از جمله مطالعه Cognasse و Sprague 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 آنتی بادی 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 نمی باشند. احتمال دیگر آن است که در اثر افزایش غلظت آنتی‌بادی، ممانعت فضایی 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 اثرگذاری مورد بررسی قرار نگرفت. مطالعات بیش‌تری لازم است تا مولکول‌های دخیل در میانکنش دو سلول و یا تاثیرگذار 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. بدین‌وسیله از موسسه عالی طب انتقال خون ایران به خاطر حمایت مالی و معنوی تشکر و قدردانی می گردد.

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): 1531-1339.
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

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 inblood and blood products: potentially pathogenic agentsand 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(Supple 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]