

القای انفجار تنفسی در سلول‌های منوسیت انسانی پس از مواجهه با میکروپارتیکل‌های پلاکتی

سمانه کوشکی (M.Sc)، فاطمه یاری* (Ph.D)، مژگان شایگان (Ph.D)

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

چکیده

سابقه و هدف: پلاکت‌های فعال شده در کنسانتره پلاکتی، وزیکول‌های غشایی آزاد می‌کنند که میکروپارتیکل‌های پلاکتی نامیده شده و می‌توانند به‌طور خود به‌خود و طی نگهداری پلاکت‌ها ایجاد شوند. مطالعات نشان می‌دهند که میکروپارتیکل‌های پلاکتی می‌توانند با سلول‌های منوسیت تشکیل توده سلولی بنمایند لذا در صدد برآمدیم تا توانایی این میکرووزیکول‌ها را در فعال کردن سلول‌های منوسیت بررسی کنیم. مواد و روش‌ها: کیسه‌های کنسانتره پلاکتی از سازمان انتقال خون استان تهران تهیه گردیدند. در روزهای نگهداری پلاکت، از کیسه‌ها، میکروپارتیکل‌ها جدا شده و با منوسیت‌های به دست آمده از کیسه خون کامل مواجه گردیدند. پس از طی زمان انکوبه، انفجار تنفسی قبل و بعد از مواجهه در منوسیت‌ها با استفاده از دی‌هیدرو رودامین-۱۲۳ (DHR-123) با به‌کارگیری تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها: سلول‌های منوسیت به دست آمده از خون محیطی انسان، بعد از مواجهه با میکروپارتیکل‌های پلاکتی فعال شده و انفجار تنفسی در آن‌ها افزایش معنی‌دار می‌یابد ($P=0/01$). این یافته نشان می‌دهد که تاثیر میکروپارتیکل‌های پلاکتی وابسته به غلظت آن‌ها می‌باشد و تاثیر بیش‌تر در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از میکروپارتیکل‌های پلاکتی به دست آمد. نتیجه‌گیری: این مطالعه توانایی میکروپارتیکل‌های پلاکتی به دست آمده از کنسانتره پلاکتی را در تحریک و فعال کردن سلول‌های منوسیت خون محیطی انسان نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: پلاکت‌های خون، میکروپارتیکل‌های مشتق از سلول، منوسیت‌ها، انفجار تنفسی

مقدمه

میکروبی در فرآورده پلاکتی [۱]، تغییرات تخریبی در ساختار و عملکرد پلاکت که به ضایعات ایجاد شده در زمان ذخیره پلاکتی یا platelet storage lesion (PSL) معروف است در طول زمان نگهداری صورت می‌گیرد [۲، ۳]. همین موضوع باعث می‌شود زمان نگهداری پلاکت به ۳-۵ روز در دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد محدود شود. از طرفی، چنان‌چه فرآورده پلاکتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود،

یکی از اهداف مهم بانک خون، تهیه محصولات با بهترین کیفیت می‌باشد که در این بین تهیه محصولات پلاکتی با کیفیت بالا دارای اهمیت می‌باشد. اما شیوه‌های کنونی نگهداری پلاکت کنسانتره با فعال شدن تدریجی پلاکت‌ها همراه است که با بیان سطحی مارکر گرانول آلفا یعنی P-سلکتین و آزادسازی محتویات گرانولی مشخص می‌شود. علاوه بر احتمال آلودگی

علی‌رغم کاهش موارد آلودگی باکتریایی، پاک‌سازی آن‌ها در بدن پس از تزریق افزایش می‌یابد [۴].

از جمله تغییرات ساختاری در زمان ذخیره پلاکتی، از دست رفتن یک پارچگی غشا پلاکت و جوانه زدن آن است که در نهایت منجر به آزاد شدن میکروپارتیکل‌های پلاکتی (Platelet-derived microparticles (PMPs) می‌شود. این میکروپارتیکل‌ها دارای ویژگی‌های پلاکتی می‌باشند [۵]. PMPها هم‌چنین در طی فعال شدن پلاکت شکل می‌گیرند و ممکن است در پاتوژن بیماری‌های قلبی-عروقی به علت اثر پیش‌التهابی (Proinflammatory)، پیش‌انعقادی (Procoagulant) و التهاب‌ساز عروقی (Vascular inflammation) مشارکت داشته باشند [۶]. سطح میکروپارتیکل‌ها در اختلالات پروترومبوتیک و التهابی، بیماری‌های قلبی-عروقی، اختلالات خودایمن، عفونت و سرطان افزایش می‌یابد. بر همین اساس تعیین میزان میکروپارتیکل‌ها ممکن است در تشخیص بیمارانی که زمینه ابتلا به اختلالات عروقی را دارند و هم‌چنین برای پیش‌پاسخ به درمان مفید باشد [۷]. به خوبی نشان داده شده است که پلاکت‌های فعال شده، PMPهای پیش‌التهابی را آزاد می‌کنند که قادرند هموستاز را با انعقاد خون و چسبیدن به دیواره رگ آسیب‌دیده پیش برده و برای بیمارانی که خونریزی فعال دارند مفیدند [۸].

تشکیل توده‌های پلاکت-گلبول سفید در آنژین ناپایدار، سکته قلبی (Myocardial infarction) و سندرم حاد کرونری (Acute coronary syndromes) گزارش شده است و ممکن است به عنوان یک مارکر اولیه در آسیب میوکاردیال بعد از انفارکتوس یا روند ترمیم عروق کرونری مطرح باشد [۶]. تشکیل توده‌های پلاکت-منوسیت در وضعیت التهابی افزایش می‌یابد و به عنوان یک شاخص اولیه در انفارکتوس میوکاردی مطرح است. در فرد مبتلا به HIV-1، افزایش منوسیت‌های CD16+ و میانکنش منوسیت‌ها با پلاکت‌ها وجود دارد [۹].

مشخص شده است که PMPها به عنوان عامل جاذب شیمیایی برای منوسیت‌ها عمل کرده و به آن‌ها متصل می‌شوند

[۱۰]. در این مطالعه با توجه به پتانسیل تشکیل مجموعه PMP-منوسیت، توانایی این میکروذرات به دست آمده از کنسانتره پلاکتی مربوط به روزهای مختلف نگهداری در القای فعال‌سازی سلول‌های منوسیت مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه کیسه‌های پلاکت کنسانتره از اهداکنندگان خون پایگاه انتقال خون تهران به صورت تصادفی تهیه گردید. در مورد گروه خونی، حجم و شکل ظاهری کیسه‌ها هیچ انتخابی وجود نداشت. 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. در مدت نگهداری، کیسه‌ها به انکوباتور 24°C - 22°C همراه با آژیتاسیون ملایم منتقل شدند. هم‌چنین کیسه‌های خون کامل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA استفاده شدند. در این پژوهش، جمعیت مورد مطالعه، سلول‌های منوسیت جدا شده از خون محیطی اهداکنندگان خون بود.

جهت انجام این تحقیق، در ابتدا میکروپارتیکل‌ها از فرآورده پلاکت کنسانتره و منوسیت‌ها از خون محیطی اهداکنندگان جدا شده و پس از بررسی ویژگی‌های آن‌ها، با یک‌دیگر مواجه شدند. سپس تاثیر میکروپارتیکل‌ها بر فعال‌سازی منوسیت‌ها ارزیابی شد.

فرآیند تهیه PMP و بررسی ویژگی‌های آن. انتخاب روزهای ۲، ۳ و ۵ برای نمونه‌برداری، بر اساس مطالعات مشابه در این زمینه صورت گرفته است. علت انتخاب روز دوم برای نمونه‌گیری، تکمیل آزمایشات غربالگری ویروسی پس از تهیه کنسانتره پلاکتی در پایگاه تهران بود. پس از پایان نمونه‌برداری در هر روز، کیسه‌ها به انکوباتور پلاکت 24°C - 20°C (همراه با آژیتاسیون) منتقل شدند.

جهت جداسازی PMP از انجام سانتریفوژ در دو مرحله g ۱۲۰۰ برای حذف گلبول‌های سفید، قرمز و پلاکت‌ها و سپس

دور بالا (۱۶۰۰۰g) جهت رسوب دادن PMP استفاده شد. سپس با تاباندن نور لیزر با طول موج ۶۳۳ nm به محلول حاوی PMP در دستگاه Malvern Zetasizer Nano ZS نوره‌های پراکنده شده از محلول شناسایی و اندازه میکروپارتیکل‌ها توسط نرم‌افزار نصب شده در دستگاه محاسبه شد. این مطالعه در دانشکده داروسازی دانشگاه تهران انجام گردید.

از طرف دیگر تعیین غلظت میکروپارتیکل‌های به دست آمده با استفاده از روش برادفورد صورت گرفت. هم‌چنین اثبات منشا پلاکتی جهت میکروپارتیکل‌های به دست آمده با به‌کارگیری آنتی‌بادی CD41 کونزوگه با FITC انجام شد. برای این منظور پس از افزودن آنتی‌بادی، انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جهت اطمینان از عدم وجود واکنش‌های ناخواسته از کنترل ایزوتیپ استفاده گردید. در نهایت آنالیز بیان CD41 با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری انجام شد.

هر دو روش ارزیابی اندازه و ویژگی میکروپارتیکل‌ها که در این مطالعه به‌کار گرفته شده‌اند، دارای حساسیت بالا بوده و با توجه به ویژگی بالای آنتی‌بادی CD41 استفاده شده در روش فلوسیتومتری و استفاده از ایزوتیپ کنترل مناسب از اختصاصیت بالا برخوردار می‌باشد.

فرآیند تهیه منوسیت‌های خون محیطی. در جداسازی سلول‌های منوسیت از خون محیطی، از محلولی به نام نایکوپرپ استفاده شد. اساس کار این روش، انجام سانتریفیوژ با استفاده از گرادیان دانسیته است به این معنا که سلول‌های مختلف با دانسیته‌های متفاوت بعد از سانتریفیوژ برحسب دانسیته خود در جایگاه خاصی قرار می‌گیرند. با توجه به این‌که جرم حجمی نایکوپرپ ۱/۰۶۸ می‌باشد و هم‌چنین به علت نزدیک بودن جرم حجمی منوسیت‌ها به آن، توانایی جداسازی منوسیت‌ها را دارد.

با توجه به مقدار مورد نیاز، ۱۰۰ میلی‌لیتر خون کامل داخل لوله‌های فالكون منتقل و در دور ۲۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس قسمت رویی به مدت ۱۰ دقیقه در

سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۲۰۰ g سانتریفیوژ شد. در این مرحله پلاکت از پلاسما جدا و پلاسمای بدون پلاکت، به لوله‌های اول بازگردانده شد.

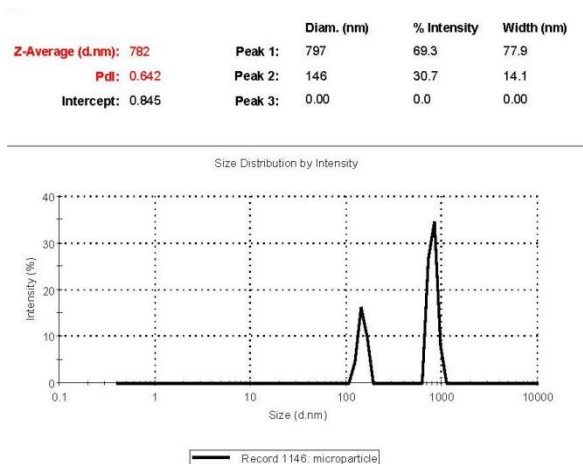
لوله‌های حاوی خون و پلاسمای عاری از پلاکت، به آرامی یک‌نواخت شده و هم حجم آن‌ها دکستران ۶٪ به لوله‌ها اضافه گردید؛ سپس به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، فاز رویی به داخل لوله‌های فالكون دیگر منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، رسوب سلولی به صورت سوسپانسیون درآمد. هم حجم رسوب به دست آمده، نایکوپرپ داخل لوله فالكون مجزا ریخته شده و سوسپانسیون سلولی به آرامی و از دیواره آن اضافه شد. لوله مذکور به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۲۵ g سانتریفیوژ گردید. پس از انجام سانتریفیوژ، محلول به صورت ۳ فاز تشکیل شد. بخش حد واسط به لوله دیگری منتقل شد و این لوله دو بار با بافر فسفات شستشو داده شد. در نهایت رسوب به دست آمده در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سوسپانسیون گشت و شمارش سلول‌های منوسیت به عمل آمد.

بررسی انفجار تنفسی در سلول‌های منوسیت خون محیطی پس از مواجهه آن‌ها با میکروپارتیکل‌های پلاکتی. ابتدا سلول‌های منوسیت جدا شده از خون محیطی توسط LPS تحریک شدند. برای این منظور به ازای ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی که حاوی ۱۰۰۰۰۰ سلول منوسیت بود از ۱ میکروگرم محلول LPS استفاده شد. پس از طی ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار و شستشو، سلول‌های منوسیت آماده مواجهه با میکروپارتیکل‌های پلاکتی شدند.

منوسیت‌های حاصل با میکروپارتیکل‌های پلاکتی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار مواجه شدند. پس از شستشو با بافر PBS، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DHR-۱۲۳ با غلظت ۲/۵ μg/ml به سلول‌ها اضافه گردید. سلول‌ها مجدد به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شدند و پس از آن توسط دستگاه فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. لازم به ذکر است

تعیین سایز میکروپارتیکل‌های پلاکتی. با تاباندن نور لیزر با طول موج ۶۳۳nm به محلول حاوی میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت در دستگاه Malvern Zetasizer Nano ZS نوره‌ای پراکنده شده از محلول شناسایی و اندازه میکروپارتیکل‌ها توسط نرم‌افزار نصب شده در دستگاه محاسبه شد. با آنالیز نوره‌ای پراکنده شده از محلول حاوی میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت توزیع اندازه میکروپارتیکل‌ها به دست آمد.

شکل ۲. نمودار درصد دانسیته میکروذرات در برابر اندازه قطر آن‌ها را بر



حسب نانومتر برای میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت را که با دستگاه Zetasizer به دست آمده است نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ملاحظه می‌شود بیش از ۶۹ درصد از میکروپارتیکل‌ها اندازه ۷۹۷ نانومتر و حدود ۳۰ درصد اندازه مولکولی ۱۴۶ نانومتر را نشان می‌دهند که در محدوده اندازه میکروپارتیکل‌ها (۱۰۰-۱۰۰۰ nm) قرار می‌گیرند.

همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، پیک اصلی که بیش از ۶۹ درصد جمعیت هتروژن را تشکیل می‌دهد نشان‌دهنده اندازه مولکولی ۷۹۷ نانومتر و حدود ۳۰ درصد اندازه مولکولی ۱۴۶ نانومتر را نشان می‌دهند که محدوده اندازه ۱۰۰-۱۰۰۰ nm مربوط به هر دو پیک نشان‌دهنده میکروپارتیکل بودن آن‌ها می‌باشد. لازم به ذکر است میکروپارتیکل‌های تعیین سایز شده مربوط به روز سوم ذخیره پلاکتی می‌باشند.

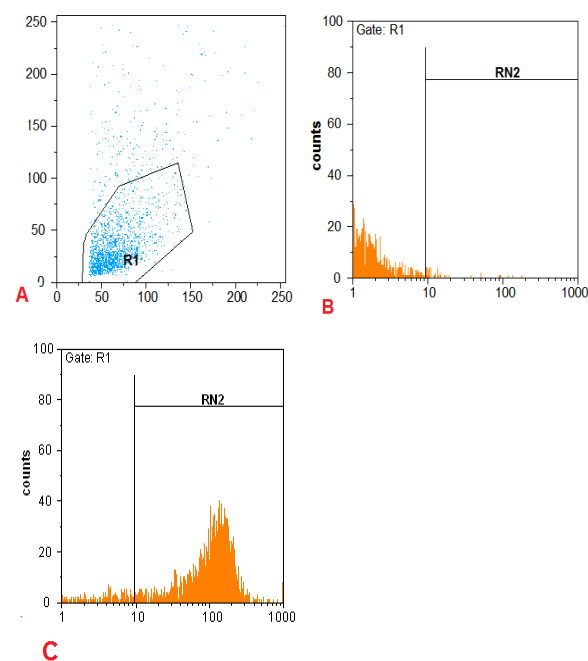
انتخاب غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای PMP پس از انجام یک مطالعه اولیه با غلظت‌های مختلف آن‌ها صورت گرفت.

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نگارش ۱۶ استفاده گردید. میانگین متغیرهای مورد نظر در روزهای دوم، سوم و پنجم تعیین شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری غیر پارامتریک Wilcoxon استفاده گردید. مقادیر $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

تعیین خلوص سلول‌های منوسیت جدا شده از خون محیطی:

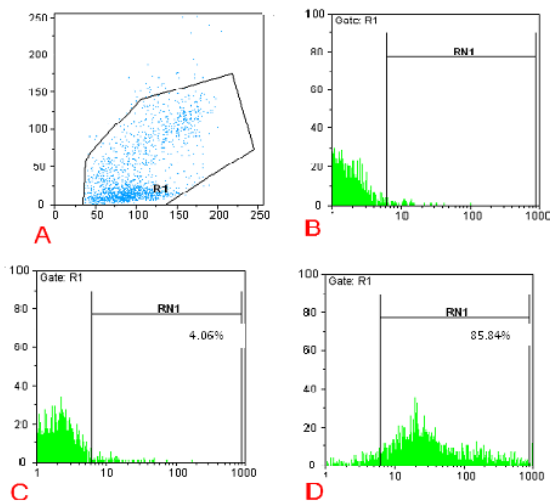
بررسی خلوص سلول‌های منوسیت با استفاده از آنتی‌بادی علیه CD14 کونژوگه با فیکواریترین با استفاده از روش فلوسیتومتری انجام شد. میانگین و انحراف معیار میزان بیان CD14 در منوسیت‌های جدا شده از کیسه خون به ترتیب $87/18 \pm 0/69$ درصد به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار نتایج فلوسیتومتری، میزان بیان سطحی CD14 در منوسیت‌های جدا شده از خون محیطی را نشان می‌دهد. (A) گیت جمعیت منوسیتی (B) کنترل ایزوتیپ PE و (C) میزان بیان سطحی CD14 در سلول‌های منوسیت جدا شده از خون محیطی را نشان می‌دهد. نتیجه منفی برای نمونه کنترل ایزوتیپ و مثبت ۸۸ درصد برای نمونه منوسیت تخلیص شده قابل مشاهده می‌باشد.

روز نمونه برداری از کنسانتره پلاکتی	منوسیت + دی هیدرورودامین	منوسیت + پلاکتی + دی هیدرو رودامین	P-value
روز دوم	۴۳/۷۸±۱۹/۴۹	۷۱/۱۰±۰/۱۴	۰/۲۹۶
روز سوم	۲۷/۴۹±۲۰/۵۲	۳۶/۳۸±۳۱/۹۸	۰/۴۷۱
روز پنجم	۵/۳۵±۲/۲۹	۸۱/۶۳±۴/۰۶	۰/۰۱

جدول ۱. نتایج به دست آمده از بررسی میانگین (Mean) و انحراف معیار (SD) انفجار تنفسی قبل و بعد از مواجهه منوسیت های تحریک شده با LPS و میکروپارتیکل های پلاکتی با بکارگیری تکنیک فلوسیتومتری (تعداد کیسه های پلاکتی جهت استخراج میکروپارتیکل ها در هر روز مطالعه، ۳ کیسه پلاکتی بوده است)

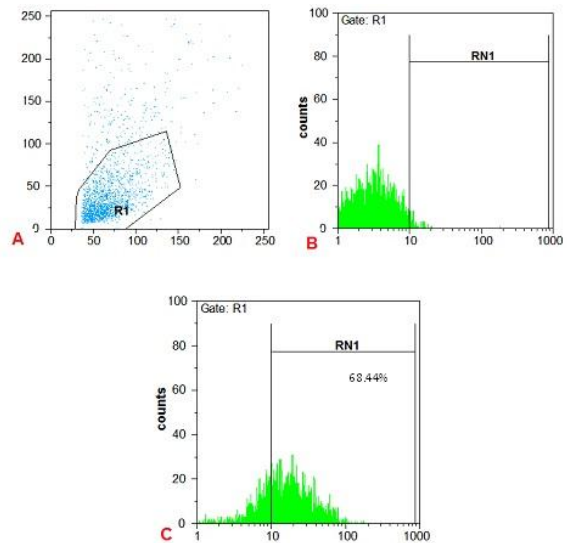


شکل ۴. نمودار نتایج فلوسیتومتری، تاثیر مواجهه میکروپارتیکل های پلاکتی و منوسیت های خون محیطی بر فعال سازی و انفجار تنفسی در منوسیت های تحریک شده با LPS نشان داده می شود. (A) گیت جمعیت منوسیت تنها (B) منوسیت تنها (C) میزان انفجار تنفسی در منوسیت ها در حضور DHR بدون مواجهه با PMP (D) میزان انفجار تنفسی در منوسیت ها بعد از مواجهه با PMP را نشان می دهد. شکل نشان دهنده قابلیت بالای میکروپارتیکل های پلاکتی در فعال سازی منوسیت ها می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر مدت زمان نگهداری پلاکت در دمای اتاق در دستگاه شیکر-انکوباتور، به دلیل احتمال آلودگی باکتریایی، ۳-۵ روز می باشد. زمان کوتاه نگهداری پلاکت، موجب کاهش ذخیره پلاکتی شده و بانک خون را ملزم به تولید روزانه آن می کند [۱۱]. مشخص شده است ۵ روز پس از ذخیره فرآورده پلاکتی، فعالیت بیولوژیکی و میزان بقای آن

تعیین ویژگی PMP جدا شده از کنسانتره پلاکتی. بررسی ویژگی میکروپارتیکل های تعیین سایز شده و جدا شده از فرآورده کنسانتره پلاکتی با استفاده از آنتی بادی علیه CD41 و کوزوگه با FITC با استفاده از روش فلوسیتومتری انجام شد. در این نمونه به عنوان مثال میزان بیان CD41 در سطح میکروپارتیکل های جدا شده در روز سوم ذخیره سازی کنسانتره پلاکتی $۶۵/۷۲ \pm ۲/۷۲$ درصد تعیین شد (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار نتایج فلوسیتومتری، میزان بیان سطحی CD41 در سطح میکروپارتیکل های به دست آمده از کیسه های پلاکت کنسانتره (A) گیت جمعیت میکروپارتیکل های پلاکتی، (B) کنترل ایزوتیپ FITC و (C) میزان بیان سطحی CD41 در میکروپارتیکل های جدا شده از کیسه های پلاکت کنسانتره را نشان می دهد. بیان مثبت و بیش از ۶۸ درصد برای میکروپارتیکل ها، نشان دهنده منشاء پلاکتی آن ها می باشد.

تاثیر مواجهه میکروپارتیکل های پلاکتی و منوسیت های

خون محیطی بر فعال سازی و انفجار تنفسی در منوسیت ها:

همان طور که در جدول ۱ و شکل ۴ مشاهده می شود

انفجار تنفسی در منوسیت ها بعد از مواجهه با میکروپارتیکل های پلاکتی نسبت به حالت قبل از مواجهه، افزایش دارد و این افزایش با PMP مربوط به پلاکت کنسانتره روز پنجم نگهداری معنی دار می باشد ($P\text{-value}=۰/۰۱$).

همکاران او از نقطه نظر فعال شدن منوسیت همخوانی دارد زیرا می‌توان CD14 با فعال شدن منوسیت مرتبط دانست هر چند روش به‌کار گرفته شده توسط محقق ذکر شده کامل نمی‌باشد.

از مطالعات دیگر که به بررسی روند انفجار تنفسی در گلبول‌های سفید پرداخته و به مزیت روش DHR-123 پرداخته‌اند می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

در مطالعه Richardson و همکاران در سال ۱۹۹۸، در بررسی روند انفجار تنفسی، استفاده از DHR-123 به عنوان یک سوپسترا با تست nitrobluetetrazolium (NBT) مقایسه شد. در این واکنش دی‌هیدرو رودامین توسط هیدروژن پراکساید به رودامین ۱۲۳ اکسید می‌شود. رودامین ۱۲۳ فلورسنت می‌باشد و توسط دستگاه فلوسیتومتری شناسایی و اندازه‌گیری می‌شود. از آنجایی که این نگرانی وجود داشت که روش فلوسیتومتری روش دقیقی نباشد این روش با تست nitrobluetetrazolium (NBT) مقایسه شد. کاهش NBT وابسته به NADPH اکسیداز است و با استفاده از این روش مراحل مهم اولیه انفجار تنفسی اندازه‌گیری می‌شود. نتایج به دست آمده نشان داد تطابق بسیار زیادی بین ارزیابی دی‌هیدرو رودامین و تست NBT وجود دارد. به علاوه دی‌هیدرو رودامین به عنوان حساس‌ترین پروب اکسیداتیو معرفی شد [۲۰، ۱۹]. در مطالعه دیگر، معلوم شد که نوتروفیل‌های مواجه شده با Phorbol myristate acetate (PMA) در مقایسه با کنترل مواجه نشده، فعالیت بالاتری را نشان می‌دهند و استفاده از دی‌هیدرو رودامین این سنجش را امکان‌پذیر می‌نماید [۲۱].

بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده در مطالعه حاضر از DHR-123 با غلظت ۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ به عنوان روشی برای بررسی انفجار تنفسی استفاده شد. علت استفاده از پروب دی‌هیدرو رودامین جواب بهتر این پروب نسبت به سایر پروب‌ها است. نتیجه مطالعه ما نشان‌دهنده افزایش فعالیت منوسیت‌ها به دنبال مواجهه این سلول‌ها با PMP در مقایسه با منوسیت مواجه شده با بافر به عنوان کنترل می‌باشد. در

کاهش می‌یابد و پلاکت‌ها تغییرات مورفولوژیک ناشی از زمان ذخیره را نشان می‌دهند. از جمله این تغییرات مورفولوژیک، از دست رفتن یک پارچگی غشاء پلاکت و هم‌چنین جوانه زدن غشاء آن است که در نهایت منجر به آزاد شدن میکروپارتیکل‌ها از آن‌ها می‌شود [۱۲]. بر طبق نتایج تحقیقات گسترده بر روی پلاکت‌ها معلوم شد که پلاکت‌ها در طول زمان ذخیره دچار آپوپتوز می‌شوند، که با آزاد شدن PMP و افزایش غلظت آن‌ها در کنسانتره پلاکتی در طول زمان ذخیره همراه می‌باشد [۱۶-۱۳].

در این مطالعه به دنبال رویارویی منوسیت‌ها و PMP به ارزیابی میزان فعال شدن منوسیت‌ها تحت تاثیر میکروپارتیکل‌ها پرداختیم. حاصل این مطالعه نشان داد منوسیت‌ها تحت تاثیر PMP فعال می‌شوند. از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم امکان بررسی شاخص‌های فعالیت در سطح سلول‌های منوسیت (CD11b/CD18) می‌باشد. با این‌حال، یکی از روش‌های اصلی در بررسی فعالیت منوسیت‌ها، اندازه‌گیری میزان انفجار تنفسی در آن‌هاست.

مطالعات محدودی مبنی بر فعال‌سازی لکوسیت‌ها از جمله منوسیت‌ها به‌وسیله پلاکت‌ها وجود دارد [۱۷]. در خصوص میکروپارتیکل‌ها، یکی از مطالعاتی که در آن از PMP به عنوان فعال‌کننده‌های منوسیت استفاده شده و در آن بیان CD14 مورد ارزیابی قرار گرفت مطالعه Vasina و همکارانش بود که دریافتند اگر سلول‌های منوسیت با میکروپارتیکل‌های حاصل از روز پنجم ذخیره‌سازی مواجهه شوند بیان CD14 در سطح سلول‌های منوسیت افزایش می‌یابد [۱۸].

در پژوهش حاضر، اثر PMP بر فعال‌سازی منوسیت با اندازه‌گیری انفجار تنفسی مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از ماده فلورسنت DHR-123 در این پژوهش نشان داد فعالیت انفجار تنفسی بعد از مواجهه منوسیت با PMP افزایش می‌یابد و این افزایش در رابطه با به‌کارگیری PMP به دست آمده از پلاکت کنسانتره در روز پنجم نگهداری معنی‌دار می‌باشد (P-value=۰/۰۱). مطالعه حاضر و پژوهش آقای Vasina و

microparticle formation in whole blood. *Thromb Res* 2011; 128: 446-451.

[7] Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 807-818.

[8] Matijevic N, Wang YW, Kostousov V, Wade CE, Vijayan KV, Holcomb JB. Decline in platelet microparticles contributes to reduced hemostatic potential of stored plasma. *Thromb Res* 2011; 128: 35-41.

[9] Singh MV, Davidson DC, Kiebal M, Maggirwar SB. Detection of circulating platelet-monocyte complexes in persons infected with human immunodeficiency virus type-1. *J Virol Methods* 2012; 181: 170-176.

[10] Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MA, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death Dis* 2011; 2: e 211.

[11] Jenkins C, Ramirez-Arcos S, Goldman M, Devine DV. Bacterial contamination in platelets: incremental improvements drive down but do not eliminate risk. *Transfusion* 2011; 51: 2555-2565.

[12] Tissota JD, Canellinia G, Rubina O, Angelillo-Scherrerb A, Delobela J, Prudenta M, et al. Blood microvesicles: from proteomics to physiology. *Translat Proteomics I* 2013; 38-52.

[13] Böing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets* 2008; 19: 96-103.

[14] Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res* 2011; 127: 370-377.

[15] Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 30: 111-142.

[16] Shah MD, Bergeron AL, Dong JF, López JA. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets* 2008; 19: 365-372.

[17] Granja T, Schad J, Schüssel P, Fischer C, Häberle H, Rosenberger P, et al. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes – A new assay suitable for bench and bedside conditions. *Thromb Res* 2015; 136: 786-796.

[18] Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MA, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death Dis* 2011; 2: e211.

[19] Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; 162: 261-268.

[20] Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 1995; 178: 89-97.

[21] Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods* 1998; 219: 187-189.

مطالعات مرتبط با فعال‌سازی منوسیت و ارزیابی فعالیت آن از محرک‌های مختلفی به جز میکروپارتیکل استفاده شده است و این تحقیق از آن جهت که تاثیر PMP را در فعال‌سازی منوسیت مورد ارزیابی قرار می‌دهد ویژگی می‌یابد.

با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده از این تحقیق و مقایسه آن با سایر مطالعات، به نظر می‌رسد که PMP به عنوان محرک منوسیت و عاملی برای فعال کردن این سلول مطرح باشد. شناخت مولکول‌های دخیل در میانکنش این میکروذرات و سلول‌های منوسیت مستلزم تلاش بیش‌تر در جهت انجام آزمایشات تکمیلی بیش‌تر در آینده می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

- [1] Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ. Monitoring of apheresis platelet bacterial contamination with an automated liquid culture system: a university experience. *Transfusion* 2003; 43: 974-978.
- [2] Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009; 41: 105-113.
- [3] Thiele T, Iuga C, Janetzky S, Schwertz H, Gesell Salazar M, Füll B, et al. Early storage lesions in apheresis platelets are induced by the activation of the integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and focal adhesion signaling pathways. *J Proteomics* 2012; 76: 297-315.
- [4] Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, Denis CV, Bergmeier W, Mayadas TN, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell* 2003; 112: 87-97.
- [5] Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood* 1991; 77: 887-895.
- [6] Tamburrelli C, Crescente M, Izzi B, Barisciano M, Donati MB, de Gaetano G, et al. Epoprostenol inhibits human platelet-leukocyte mixed conjugate and platelet

Induction of respiratory burst in human monocytes after treating with platelet-derived microparticles

Samaneh Koushki (M.Sc), Fatemeh Yari (Ph.D)^{*}, Mojgan Shaiegan (Ph.D)
Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

(Received: 25 Oct 2015; Accepted: 11 Apr 2016)

Introduction: Activated platelets in platelet concentrate, release membranous vesicles that called platelet microparticles and can be created spontaneously during the storage of platelets. Studies have shown that platelet microparticles can form aggregates with monocytes so we intended to survey the ability of these microvesicles to activate monocytes.

Materials and Methods: Platelet concentrate bags (PCs) were prepared from Iranian Blood Transfusion Organization in Tehran. Sampling of the bags and isolation of PMP was carried out during storage. Besides, the respiratory burst of monocytes was measured by flow cytometry technique before and after treatment with PMP using di-hydrorhodamine-123 (DHR-123).

Results: Monocyte cells derived from human peripheral blood were activated after exposure to platelet microparticles and intracellular respiratory burst was significantly increased (P-value = 0.01). These findings suggest that PMPs have a dose-dependent effect on monocytes and they are more effective at the concentration of 500 micrograms per milliliter.

Conclusion: This study showed the potential of platelet microparticles in the stimulation and activation of human peripheral blood monocytes.

Keywords: Blood Platelets, Cell-Derived Microparticles, Monocytes, Respiratory Burst

* Corresponding author. Tel: +98 21 82052238
f.yari@ibto.ir