



تأثیر پلاکت در فرآورده کنستانتره پلاکتی بر فعال سازی سلول های منوسیت خون محیطی انسان

نرگس سادات رضوی حسینی^۱، فاطمه یاری^{۲*}، افسانه آقایی^۳

چکیده

مقدمه: سلول های منوسیت به علت داشتن مولکول هایی در سطح خود همچون لیگاند گلیکوپروتئین P سلکتین (PSGL-1)، قادر به برقراری واکنش های سلولی با پلاکت ها و تشکیل کمپلکس منوسیت- پلاکت هستند. در این مطالعه، تأثیر مجاورت پلاکت موجود در فرآورده پلاکت کنستانتره و سلول های منوسیت خون محیطی در *in vitro* بررسی شد تا به عنوان مدلی جهت پیش بینی واکنش های احتمالی پلاکت تزریقی و سلول های منوسیت خون محیطی در بدن و متعاقب آن فعال سازی منوسیت ها استفاده گردد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، کیسه های خون کامل و کنستانتره پلاکتی از پایگاه منطقه ای انتقال خون تهران تهیه گردید. پس از جداسازی سلول های منوسیت از خون کامل، این سلول ها با پلاکت های به دست آمده از کنستانتره پلاکتی مواجه گردیدند. فعالیت منوسیت ها در حالت اولیه و پس از مواجهه با پلاکت ها با بکارگیری ماده دی هیدرورودامین-۱۲۳ (DHR-123) و سنجش انفجار تنفسی بررسی شد. نتایج حاصل به وسیله آزمون آماری Wilcoxon تحلیل شد.

نتایج: خلوص سلول های منوسیت به دست آمده با روش نایکوپرپ $2 \pm 86/1$ درصد، تعیین گردید. پس از مواجهه پلاکت ها و سلول های منوسیت خون محیطی، منوسیت ها فعال شده و میزان انفجار تنفسی این سلول ها افزایش یافت. این افزایش در روز پنجم از نظر آماری معنی دار بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه نشان داده شد که پلاکت ها سبب تحریک و فعال سازی منوسیت ها می شوند. جهت شناخت مولکول های دخیل در میانگنش این سلول ها، نیاز به انجام مطالعات تکمیلی می باشد.

واژه های کلیدی: کنستانتره پلاکتی، سلول منوسیت، انفجار تنفسی

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

۲- دانشیار، گروه ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران

۳- استادیار، گروه ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱۸۲۰۵۲۲۳۸، پست الکترونیکی: f.yari@ibto.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۵

مقدمه

امروزه تزریق فرآورده پلاکتی جهت جلوگیری یا درمان خونریزی در بیماران ترومبوسیتوپنی، بیماران دارای نقص عملکردی پلاکت مانند افراد مبتلا به ضایعات انکولوژیک و هماتولوژیک، تروما، بیماران تحت عمل جراحی قلب و جراحی عمومی کاربرد دارد (۱).

بهترین زمان مصرف این فرآورده حداکثر تا ۲۴ ساعت بعد از تهیه این فرآورده است (۲). در حال حاضر مدت زمان نگهداری کنسانتره پلاکتی ۳-۵ روز است. این زمان کوتاه سبب محدودیت ذخیره فرآورده پلاکتی در رابطه با نیازهای بالینی شده و موجودی در دسترس این فرآورده را به شدت محدود می‌کند (۱). گاه تجویز کیسه پلاکتی به بیمار نتایج مورد انتظار را در پی ندارد، یا در فرد دریافت‌کننده، عوارض نامطلوب ناشی از تزریق پلاکت اتفاق می‌افتد. به عبارت دیگر فرآورده پلاکتی اگرچه از نظر ظاهر و به لحاظ شمارش سلولی مورد تایید است، اما طی مدت ذخیره کیسه پلاکتی، تغییراتی در پلاکت‌ها صورت می‌گیرد. از عمده تغییرات فرآورده پلاکتی، فعال شدن آنها است. بعد از فعال شدن مولکول‌های متعددی در سطح پلاکت بیان می‌شوند (۳). P سلکتین (GMP-140, PADGEM)، پروتئین داخل غشایی است و در سلول‌های اندوتلیال و گرانول‌های آلفای پلاکت وجود دارد؛ ترشح فرم محلول آن از منبع اندوتلیوم نیز گزارش شده است. پس از تزریق پلاکت در بیماران ترومبوسیتوپنی، لکوسیت‌های خون محیطی پیرامون سلول پلاکتی تجمع می‌یابند. از مهمترین این سلول‌ها، منوسیت‌ها می‌باشند که به علت داشتن مولکول‌هایی در سطح خود همچون PSGL-1 و CD40، قادر به برقراری واکنش با پلاکت‌ها و تشکیل اگرگیت‌های پلاکت-منوسیت در بدن می‌باشند (۴-۶). حضور کمپلکس‌های منوسیت-پلاکت در بیماری‌هایی همچون اختلالات میلوپرولیفراتیو، بیماری آلزایمر، انفارکتوس حاد قلبی، همودیالیز، سندروم آنتی فسفولیپید، آرتريت روماتوئید، آنمی سیکل سل مشاهده شده است. مطالعات نشان داده‌اند در بعضی بیماری‌ها

تشکیل این مجموعه‌های سلولی، می‌تواند در بدن منجر به بروز مشکلاتی مثل انسداد عروق شده و از طرف دیگر با فعال‌سازی سلول‌ها موجب پیشبرد روند التهابی گردد (۷).

انفجار تنفسی که مبحثی از ایمنی ذاتی می‌باشد، پدیده‌ای است که طی آن سلول‌هایی چون نوتروفیل، مونوسیت و ماکروفاژ با تولید یون‌های اکسیژن سبب از بین رفتن پاتوژن‌ها می‌شوند. آنزیم موثر در این روند NADPH oxidase است. محرک‌های خارج سلولی مسیر سیگنالینگ را فعال کرده و به تجمع NADPH oxidase کمک می‌کنند که این آنزیم نیز پس از فعال شدن، یون سوپراکسید (O_2^-) و H_2O_2 را تولید می‌کند، سپس مسیر سیگنالینگ داخل سلولی و در نهایت بیان یک سری فاکتورهای رونویسی آغاز می‌گردد. تحریک انفجار تنفسی توسط محرک‌های بسیاری از جمله بعضی سایتوکاین‌ها، فوربول استر، یونوفورهای کلسیم، لکتین‌های مختلف صورت می‌گیرد (۸،۹).

هدف این مطالعه بررسی قابلیت پلاکت در واکنش با منوسیت‌ها و تحریک فعال‌سازی آنها و بروز انفجار تنفسی به دنبال رویارویی با آنها در محیط کشت بود. همچنین این تاثیر در رابطه با پلاکت‌های به دست آمده از فرآورده‌های پلاکت کنسانتره مربوط به روزهای مختلف نگهداری مورد مقایسه قرار گرفته است.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات موسسه عالی طب انتقال خون انجام گردید، کیسه‌های خون کامل و کنسانتره پلاکتی از پایگاه منطقه‌ای انتقال خون تهران تهیه گردیدند. پس از جداسازی سلول‌های منوسیت از خون کامل و بررسی خلوص آنها، این سلول‌ها با پلاکت‌های به دست آمده از کنسانتره پلاکتی مواجه گردیدند. فعالیت منوسیت‌ها در حالت اولیه و پس از مواجهه با پلاکت‌ها با بکارگیری ماده دی‌هیدرورودامین-۱۲۳ (DHR-123) و بکارگیری روش فلوسایتومتری جهت سنجش انفجار تنفسی بررسی شد.

فرآیند تحویل فرآورده پلاکت کنسانتره و نمونه‌برداری و شمارش پلاکتی آن

۹ کیسه پلاکت کنسانتره از اهداکنندگان پایگاه انتقال خون تهران تهیه گردید. انتخاب تعداد کیسه‌ها با توجه به برخی مطالعات مشابه صورت گرفت (۱۰). انتخاب کیسه‌ها به صورت تصادفی انجام و در مورد گروه خونی، حجم و شکل ظاهری کیسه‌ها هیچ گزینه‌ای صورت نگرفت. 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 گرفته شده و به سرعت به انکوباتور $22-24^{\circ}\text{C}$ همراه با آزیتاسیون ملایم منتقل شدند. علت انتخاب روز دوم برای نمونه‌گیری، تکمیل آزمایشات غربالگری ویروسی پس از تهیه کنسانتره پلاکتی در پایگاه انتقال خون تهران بود. پس از پایان نمونه‌برداری در هر روز، کیسه‌های پلاکت کنسانتره مجدداً به انکوباتور ویژه پلاکت همراه با آزیتاسیون منتقل شدند. نمونه‌های پلاکتی جهت حذف گلبول‌های قرمز و سفید به مدت ۱۲ دقیقه با دور 150g سانتریفیوژ و سوپ رویی آنها که حاوی پلاکت، پلاسما و میکروپارتیکل‌های پلاکتی بود به لوله دیگر منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه با دور 4200rpm سانتریفیوژ شد. در این مرحله رسوب حاوی پلاکت به دست آمده و به لوله دیگر منتقل و کاملاً یکنواخت و سوسپانسیون شد. در هر روز کاری قبل از شروع کار باید از پلاکت به دست آمده از کیسه پلاکتی توسط دستگاه سل‌کانتر، شمارش به عمل می‌آمد.

جداسازی سلول‌های منوسیت از خون محیطی، شمارش و تعیین بقای سلول‌های به دست آمده

در جداسازی سلول‌های منوسیت از خون محیطی، از محلولی به نام Nycoprep محصول شرکت (Progen Biotechnik GmbH Heidelberg, Germany) 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 $1/068$ می‌باشد و همچنین به علت نزدیک بودن جرم حجمی منوسیت‌ها به آن، توانایی جداسازی منوسیت‌ها را دارد.

با توجه به مقدار مورد نیاز، 100 میلی‌لیتر خون کامل داخل لوله‌های فالكون منتقل و در دور 200g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس قسمت رویی به مدت 10 دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور 1200g سانتریفیوژ شد. در این مرحله پلاکت از پلاسما جدا و پلاسما بدون پلاکت، به لوله‌های اول باز گردانده شد.

لوله‌های حاوی خون و پلاسما عاری از پلاکت، به آرامی یکنواخت شده و هم حجم آنها دکستران 6% به لوله‌ها اضافه گردید؛ سپس به مدت 60 دقیقه در انکوباتور 37°C قرار داده شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، فاز رویی به داخل لوله‌های فالكون دیگر منتقل و به مدت 10 دقیقه در دور 4000rpm سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خالی و 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 15 دقیقه با دور 425g سانتریفیوژ گردید. پس از انجام سانتریفیوژ، محلول به صورت 3 فاز تشکیل شد. بخش رویی دور ریخته شده و بخش حد واسط به لوله دیگری منتقل شد و این لوله دو بار با بافر فسفات شستشو داده شد. (شستشو با بافر فسفات به مدت 10 دقیقه با دور 2500rpm انجام شد). در نهایت رسوب به دست آمده در 1 میلی‌لیتر بافر فسفات سوسپانسیون گشت و شمارش سلول‌های منوسیت‌ها به عمل آمد.

بررسی خلوص سلول‌های منوسیت به دست آمده از خون محیطی

برای این منظور از روش فلوسایتومتری استفاده شد که از روش‌های بسیار حساس در ارزیابی‌های سلولی محسوب می‌شود. در یک میکروتیوب، 100 میکرولیتر از منوسیت‌های

سلول منوسیت خالص شده، با LPS تحریک و سپس با پلاکت مواجه شد. در نهایت فعالیت سلول‌های منوسیت با بکارگیری دی هیدروردامین ۱۲۳ و روش فلوسایتومتری ارزیابی شد.

مراحل انجام کار: جهت بالابردن حساسیت کار و آستانه فعالیت منوسیت، از غلظت ۱۰ میکروگرم در میکرولیتر LPS (Lipopolysaccharides (Merck, Germany)) استفاده شد. به این منظور به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون منوسیتی، ۱ میکرولیتر از محلول ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر LPS اضافه شد و میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار قرار گرفت؛ سپس شستشو با بافر فسفات به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۴۰۰ g جهت حذف LPS انجام شد. درون یک چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای سلول‌های منوسیت تحریک شده با LPS ریخته و به آن پلاکت اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار قرار گرفت. پس از اتمام زمان مواجهه، محتوای درون چاهک چند بار پیتاژ و به داخل میکروتیوب منتقل شد؛ سپس شستشو با محلول بافر فسفات به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm صورت گرفت. پس از سانتریفیوژ بافر فسفات اضافی دور ریخته شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر باقی گذاشته شد.

در این روش دو چاهک تحت عنوان کنترل لحاظ شدند؛ در هر دو چاهک کنترل، منوسیت تحریک شده به تنهایی ریخته شد و به همراه چاهک‌های دیگر به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار قرار گرفتند. در ادامه به میکروتیوب حاوی کونزوگه پلاکت- منوسیت و یکی از میکروتیوب‌های کنترل، ۱۰۰ میکرولیتر (DHR (Cayman chemical, USA)) با غلظت ۲/۵ μg/ml افزوده و برای مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار قرار گرفتند؛ سپس با افزودن ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، سوسپانسیون تهیه و آنالیز جهت بررسی انفجار تنفسی توسط دستگاه فلوسیتومتری صورت گرفت (۱۱).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از این مطالعه به وسیله آزمون آماری Wilcoxon آنالیز و مقادیر $P\text{-value} \leq 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

شسته شده با بافر فسفات، که محتوی ۱۰۰ هزار سلول بود و ۲ میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD14 کونزوگه با فیکواریترین (PE) (Dako, Denmark) اضافه شد. سپس در یخچال به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گشته و پس از اتمام زمان انکوبه و شستشو با بافر فسفات، رسوب سلولی کاملاً سوسپانسیون شده و ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به سوسپانسیون اضافه شد و لوله جهت آنالیز با دستگاه فلوسایتومتری (Partec -pasIII, Germany) آماده شد.

مواجهه پلاکت و سلول‌های منوسیت و بررسی تاثیر روزهای نگهداری پلاکت در فعال‌سازی منوسیت‌های خون محیطی

پلیت ۲۴ خانه‌ای برای مواجهه منوسیت‌های خون محیطی با پلاکت انتخاب و محیط مواجهه، هنکس در نظر گرفته شد. یک چاهک که محتوی منوسیت‌ها بدون پلاکت بود تحت عنوان چاهک کنترل منفی تلقی گشت. میانگین تعداد منوسیت شمارش شده در هر میلی‌لیتر در هر روز کاری $10^6 \times 1$ سلول تنظیم شده و میزان ۲۰۰ میکرولیتر (۲۰۰ هزار سلول) از آن همراه با محیط هنکس به داخل هر چاهک ریخته شد. سپس پلاکت‌ها در حجم ۲۰۰ میکرولیتر ($10^7 \times 10$ سلول) به چاهک محتوی سلول منوسیت به این صورت اضافه گردید که با توجه به شمارش پلاکتی انجام شده توسط سل‌کانتر، از عمل تغلیظ با سانتریفوژ و یا رقیق کردن با بافر فسفات برای تنظیم تعداد آنها استفاده می‌گردید. در ادامه به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر نیز محیط کشت اضافه شده و پس از یکنواخت‌سازی پلیت به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار انکوبه می‌شد.

بررسی تاثیر مواجهه پلاکت و منوسیت‌های خون محیطی بر انفجار تنفسی در منوسیت‌های خون محیطی با استفاده از روش فلوسایتومتری

کلیات: دی هیدروردامین ۱۲۳، یک معرف غیرفلورسنت است که در زمان فعالیت سلولی، به ردامین ۱۲۳ اکسید شده و ویژگی فلورسنت سبزمی‌یابد (۱۱). جهت انجام آزمایش، در ابتدا

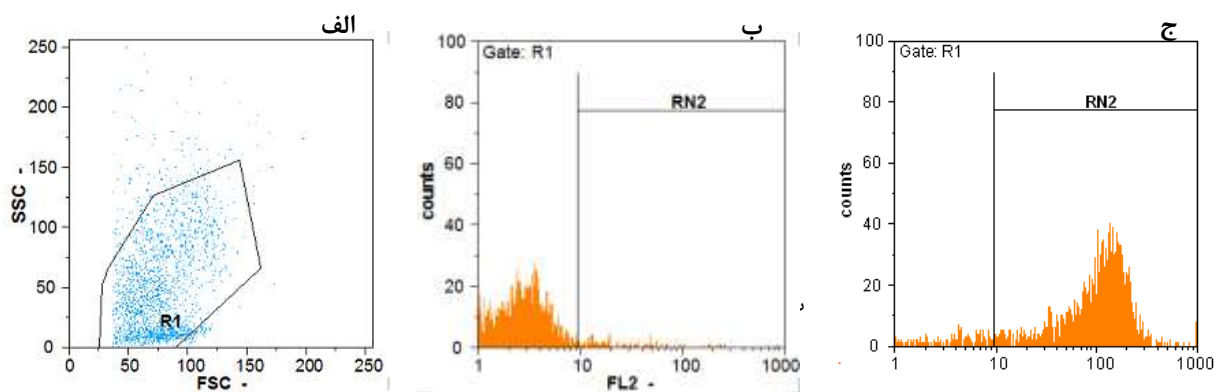
نتایج

نتایج شمارش پلاکتی

جهت انجام شمارش پلاکتی از کیسه‌های پلاکت کنسانتره در روزهای ۲، ۳، ۵ ذخیره پلاکت، از دستگاه شمارش‌گر سلول‌ی سل کانتر (Sysmex (Kobe, Japan) استفاده شد. نتایج نشان داد شمارش پلاکتی در طول زمان ذخیره کاهش می‌یابد که این کاهش شمارش پلاکتی، در روز پنجم نسبت به روز سوم نگهداری پلاکت و روز پنجم نسبت به روز دوم نگهداری پلاکت معنی‌دار (P-value=۰/۰۰۸) ولی در روز سوم نسبت به روز دوم نگهداری پلاکت معنی‌دار نیست (P-value=۰/۱). میانگین و

انحراف معیار شمارش پلاکتی در روزهای ۲، ۳، ۵ ذخیره پلاکت کنسانتره با استفاده از دستگاه شمارش‌گر سلولی (Sysmex $\times 10^3 / \mu\text{l}$) به ترتیب: $۹۳۹/۲۲ \pm ۱۶۵/۹۶$ ، $۸۳۵/۱۱ \pm ۱۲۸/۶۵$ و $۶۰۴/۴۴ \pm ۱۶۶/۲۱$ تعیین گردید. بررسی خلوص سلول‌های منوسیت به دست آمده از خون محیطی

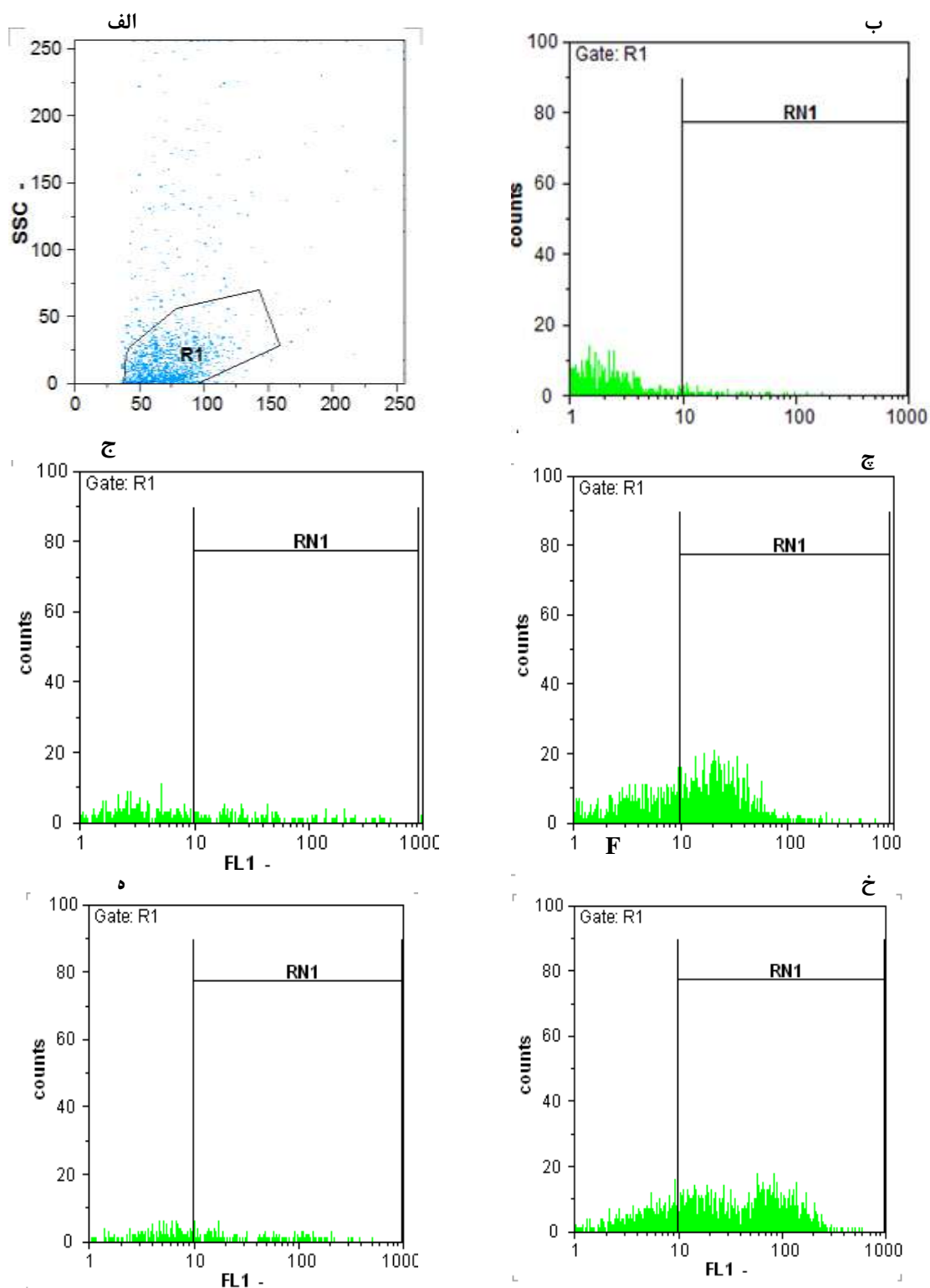
جهت تعیین خلوص سلول‌های منوسیت از آنتی‌بادی ضد CD۱۴ (یکی از مارکرهای اصلی منوسیت‌ها CD۱۴ است) استفاده شد. نتایج آزمایشات فلوسیتومتری (نمودار ۱) نشان داد که درصد خلوص سلول‌های منوسیت‌ها حاصل از کیسه خون محیطی، $۸۷/۱۸ \pm ۳$ درصد است.



نمودار ۱: میزان بیان سطحی CD۱۴ در منوسیت‌های جدا شده از خون محیطی با روش فلوسیتومتری (الف) گیت جمعیت منوسیت‌ها (ب) کنترل ایزوتیپ PE و (ج) میزان بیان سطحی CD۱۴ در سلول‌های منوسیت جدا شده از خون محیطی

فعال‌کننده منوسیتی "لیپو پلی ساکارید" LPS در غلظت پایین استفاده شد. نتایج فعالیت انفجار تنفسی قبل و بعد از مواجهه منوسیت و پلاکت در نمودارهای ۲ و ۳ و جدول ۱ آورده شده است.

بررسی تاثیر مواجهه پلاکت و منوسیت‌های خون محیطی بر فعال‌سازی و انفجار تنفسی در منوسیت‌ها از آنجایی‌که میزان فعالیت منوسیت خون محیطی در شرایط عادی پایین است، جهت افزایش حساسیت آزمایشات از



نمودار ۲: آنالیز فلوسایتومتری تاثیر مواجهه پلاکت و سلول‌های مونوسیت خون محیطی بر فعال‌سازی و انفجار تنفسی در مونوسیت‌ها ی تحریک شده با LPS را نشان می‌دهد. (الف) گیت جمعیت مونوسیت- پلاکت، (ب) کنترل ایزوتیپ FITC (ج) میزان انفجار تنفسی مونوسیت‌ها قبل از مواجهه در روز دوم نگهداری پلاکت (چ) میزان انفجار تنفسی در مونوسیت‌ها بعد از مواجهه با پلاکت در روز دوم نگهداری پلاکت (ه) میزان انفجار تنفسی مونوسیت‌ها قبل از مواجهه در روز پنجم نگهداری پلاکت (خ) میزان انفجار تنفسی در مونوسیت‌ها بعد از مواجهه با پلاکت در روز پنجم نگهداری پلاکت

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار انفجار تنفسی در منوسیت قبل و بعد از مواجهه منوسیت و پلاکت در شرایطی که منوسیت از قبل با LPS تحریک شده است. (اختلاف فعالیت منوسیت با کونژوگه منوسیت-پلاکت و P-value مقایسه شده است).

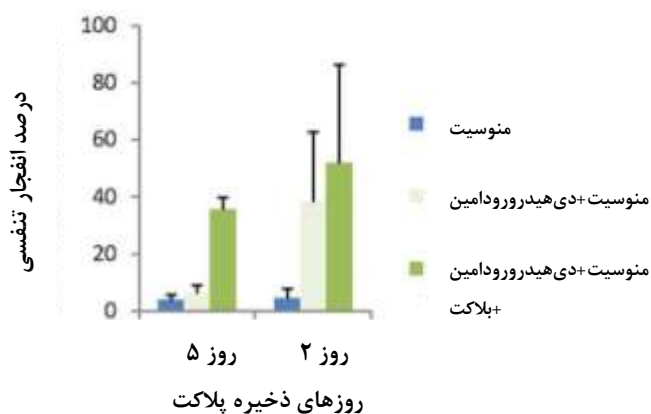
فعالیت در روز نگهداری	منوسیت	منوسیت + دی هیدرو رودامین	کونژوگه پلاکت - منوسیت + دی هیدرو رودامین	*P-value روش Wilcoxon آماري
در صد فعالیت انفجار تنفسی در روز ۲	۴/۵۹±۳/۳۰	۳۸/۱۸±۲۴/۶۲	۵۱/۸۳±۳۴/۵۵	۰/۳۰۴
در صد فعالیت انفجار تنفسی در روز ۵	۳/۹۳±۱/۶۸	۶/۲۸±۲/۸۴	۳۵/۶۹±۴/۱۵	۰/۰۰۱

مورد مقایسه آماری قرار گرفته است.

در جدول ۱، علت اختلاف واریانس متغیر در روز های ۲ و ۵ می تواند مربوط به استفاده از کیسه خون با طول عمر بیشتر برای جداسازی منوسیت در روز ۵ باشد که پتانسیل پاسخ دهی آن نسبت به روز ۲ کاهش یافته است. زیرا کیسه خون در طول انجام آزمایش جهت جداسازی منوسیت در یخچال نگهداری می شد.

لازم به ذکر است، نمونه های کنترل و تست در هر روز به عنوان نمونه های وابسته در نظر گرفته شده و روش Wilcoxon برای آنالیز آنها در نظر گرفته شده است زیرا اساس نمونه کنترل و تست یکی بوده و منوسیت است که در نمونه تست به آن پلاکت اضافه شده است. از طرف دیگر، از آنجائیکه هدف مطالعه، مقایسه تاثیر پلاکت بر فعالیت منوسیت در هر روز مواجهه بوده، نتیجه مربوط به قبل و بعد از مواجهه، در هر روز

انفجار تنفسی منوسیت پس از مواجهه با پلاکت



نمودار ۳: نمودار مقایسه تاثیر مواجهه پلاکت و منوسیت های خون محیطی بر فعال سازی و انفجار تنفسی در منوسیت ها با استفاده از LPS در روزهای ۲ و ۵ نگهداری پلاکت با بکارگیری دی هیدرو رودامین-۱۲۳ در روش فلوسیتومتری

بحث

منجر شود (۷،۱۴). این تجمعات در چند بیماری همچون سیروز کبدی و HIV گزارش شده اند (۱۵،۱۶). در این مطالعه، مجاورت پلاکت و منوسیت در محیط کشت صورت گرفته و میزان فعال شدن منوسیت ها دنبال شد. قبل از این مواجهه، جهت افزایش حساسیت آزمایشات از LPS جهت

مطالعات نشان داده اند پلاکت و یا ترشحات پلاکتی می توانند با سلول های مختلف بدن به ویژه لکوسیت ها میانکنش دهند. میانکنش های پلاکت-نوتروفیل (۱۲) و پلاکت- منوسیت (۱۳) تأیید شده است. تجمع لکوسیت در اطراف پلاکت و تشکیل کمپلکس پلاکت- لکوسیت در عروق، می تواند به انسداد عروقی

در شرایط گردشی پتانسیل بالای اتصال منوسیت به پلاکت در مقایسه با نوتروفیل نشان داده شد (۱۳)، اما مطالعه مشابهی که در محیط کشت به بررسی رویارویی منوسیت و پلاکت بپردازد، یافت نشد. با این حال، قابل ذکر است که در فرآورده پلاکت کنستانتیره، بررسی در خصوص ارزیابی فعال شدن سلول‌های منوسیت باقیمانده در کیسه پلاکتی صورت گرفته است. مطالعه Grey و همکاران نشان داد که منوسیت‌ها در فرآورده پلاکت کنستانتیره، ویژگی فعال داشته و افزایش غلظت سایتوکاین‌هایی همچون IL-6 و IL-1 β با تعداد منوسیت‌ها در کیسه پلاکتی رابطه دارد (۲۰). با این حال آنها به طور مستقیم به بررسی فعالیت سلول‌های منوسیت نپرداخته و از طریق اندازه‌گیری سایتوکاین‌های مترشح از منوسیت‌ها فعالیت آنها را اندازه‌گیری نمودند. با گذشت زمان و ابداع روش‌های حساس در سنجش فعالیت منوسیت‌ها همچون DHR-123 امکان این نوع بررسی به راحتی فراهم شد.

مشکل در تامین خون کامل تازه در حجم بالا و عدم کفایت حجم نمونه از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود. به علاوه در برخی موارد، امکان انجام سریع فلوسایتومتری فراهم نبوده و منجر به حذف برخی نمونه‌ها از مطالعه شد.

نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان داد، میانکنش پلاکت- منوسیت به دنبال مواجهه این دو سلول در محیط کشت صورت می‌گیرد و حاصل آن فعال‌سازی سلول‌های منوسیت و بروز انفجار تنفسی در این سلول‌ها می‌باشد. در مطالعات آتی می‌توان با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، به بررسی نقش مولکول‌های دخیل در میانکنش پلاکت- منوسیت پرداخت.

سیاسگزاری

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.

تحریک اولیه سلول‌های منوسیت استفاده شد. پس از مواجهه منوسیت با LPS چندین مسیر داخل سلولی فعال می‌شود (۱۷). مقایسه نتایج فلوسیتومتری منوسیت‌ها در سه وضعیت متفاوت، منوسیت‌های تحریک شده با LPS، منوسیت‌های تیمار شده با DHR-123 و تحریک شده با LPS و بالاخره منوسیت‌های تحریک شده با LPS، تیمار شده با DHR-123 و مواجهه شده با پلاکت تأیید کرد که پلاکت قادر به فعال‌سازی منوسیت‌ها است و نتایج فلوسیتومتری نشان داد فعالیت انفجار تنفسی بعد از مواجهه منوسیت‌های خون محیطی با پلاکت نگهداری شده در روز دوم و پنجم افزایش می‌یابد، که این افزایش در روز دوم معنی‌دار نمی‌باشد (P-value=۰/۳۰۴)، اما در روز پنجم از نظر آماری معنی‌دار است (P-value=۰/۰۰۱).

در مطالعه حاضر، با استفاده از ماده فلورسنس دی‌هیدرو رودامین ۱۲۳ (DHR-123) با غلظت ۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ و روش فلوسیتومتری، محصولات اکسیژن فعال ROS (reactive oxygen species) حاصل از انفجار تنفسی ارزیابی گردید. پس از مواجهه پلاکت با منوسیت‌ها، فلورسانس سبز رنگ ناشی از تاثیر محصولات ROS حاصل از انفجار تنفسی بر روی ماده DHR-123 با روش فلوسیتومتری سنجیده شد. علت استفاده از DHR-123 در این مطالعه، در دسترس بودن و داشتن پاسخ‌های بهتر این پروب نسبت به سایر پروب‌ها بود. در برخی مطالعات دیگر نیز هم‌راستا با این مطالعه، برای ارزیابی انفجار تنفسی منوسیت‌ها، از ماده DHR-123 استفاده شده است (۱۸). همین‌طور برخی محققین از ماده DHR-123 جهت ارزیابی فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل، مشابه کار Xie استفاده کردند (۱۱). در یک مطالعه ضمن استفاده از ماده DHR-123 که تحت تاثیر محصول انفجار تنفسی (H_2O_2) به رودامین تبدیل می‌شود، با کمک اسپکتروفتومتری و آزمون (NBT:nitroblue-tetrazolium)، به سنجش رنگ آبی فورمازون ایجاد شده پرداختند. هم‌خوانی زیادی بین نتایج ارزیابی دی‌هیدرو رودامین و تست NBT مشاهده شده و DHR-123 به عنوان حساس‌ترین پروب اکسیداتیو معرفی شد (۱۱، ۱۹). مطالعه ما با توجه به مطالعات مشابه، DHR-123 را در ارزیابی انفجار تنفسی انتخاب نمود.

References:

- 1- Apelseh TO, Hervig T. *In vitro evaluation of platelet concentrates during storage: Platelet counts and markers of platelet destruction*. Transfus Apher Sci 2007; 37(3): 261-68.
- 2- Shrivastava M. *The platelet storage lesion*. Transfus Apher Sci 2009; 41(2): 105-13.
- 3- Baumgarten A, Wilhelmi M, Ganter M, Rohn K, Mischke R. *Changes of platelet function and blood coagulation during short-term storage of CPDA-1-stabilised ovine blood*. Res Vet Sci 2011; 91(1): 150-58.
- 4- Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA. *Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity*. Thromb Res 2011; 127(3): 180-83.
- 5- van Kooten C, Banchereau J. *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol 2000; 67(1): 2-17.
- 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- Fernandes LS, Conde ID, Smith CW, Kansas GS, Snapp KR, Bennet N, et al. *Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with aIIb β 3 and aMh2, in coronary stenting*. Thrombosis Res 2003; 111(3): 171-77.
- 8- Iles KE, Forman HJ. *Macrophage signaling and respiratory burst*. Immunol Res 2002; 26(1-3): 95-105.
- 9- Dahlgren C, Karlsson A. *Respiratory burst in human neutrophils*. J Immunol Methods 1999; 232(1): 3-14.
- 10- Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigan V, Ferro A. *Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes*. PLoS One 2011; 6(10): e25595.
- 11- Xie RF, Hu P, Wang ZC, Yang J, Yang YM, Gao L, et al. *Platelet-derived microparticles induce polymorphonuclear leukocyte-mediated damage of human pulmonary microvascular endothelial cells*. Transfusion 2015; 55(5): 1051-57.
- 12- Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation*. Blood Rev 2007; 21(2): 99-111.
- 13- Ahn KC, Jun AJ, Pawar P, Jadhav S, Napier S, McCarty OJ, et al. *Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow*. Biochem Biophys Res Commun 2005; 329(1): 345-55.
- 14- Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Nuyens V, Ducobu J, Kherkofs M. *Monocyte-platelet complexes on CD14/CD16 monocyte subsets: relationship with ApoA-I levels. A preliminary study*. Cardiovasc Pathol 2008; 17(5): 285-88.
- 15- Sayed D, Amin NF, Galal GM. *Monocyte-platelet aggregates and platelet micro-particles in patients with post-hepatic liver cirrhosis*. Thromb Res 2010; 125(5): e228-33.
- 16- 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(2): 170-76.

- 17- Guha M, Mackman N. *LPS induction of gene expression in human monocytes*. Cell Signal 2001; 13(2): 85-94.
- 18- 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(1): 89-97.
- 19- Smith JA, Weidemann MJ. *Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry*. J Immunol Methods 1993; 162(2): 261-68.
- 20- Grey D, Erber WN, Saunders KM, Lown JA. *Monocyte activation in platelet concentrates*. Vox Sang 1998; 75(2): 110-14.

Effects of Platelets on Platelet Concentrate Product on the Activation of Human Peripheral Blood Monocyte Cells

Razavi Hosseini NS (MSc)¹, Yari F (PhD)*², Aghaei A(PhD)³

^{1,2,3} *Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.*

Received: 16 Sep 2015

Accepted: 31 Dec 2015

Abstract

Introduction: Monocytes can interact with platelets due to their surface molecules such as P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), and form monocyte-platelet complex. In the present study, the effects of platelets interaction of platelet concentrates (PCs) and peripheral blood monocytes were investigated in vitro as a model to predict the probable interactions of these cells and consequently activation of monocytes.

Methods: In this experimental study, units of whole blood and PCs were prepared from Tehran Blood Transfusion Center. After isolation of monocytes from the whole blood, these cells were treated with PC-derived platelets. The activation of monocytes was assessed before and after treatment by the analysis of the respiratory burst of monocytes using dihydrorhodamine 123 (DHR-123). The study data were analyzed using the non-parametric test of Wilcoxon.

Results: The purity of monocytes was determined as 86.1 ± 2 using NycoPrep method. The respiratory burst of monocytes was increased after exposure with platelets. In fact, the difference was significant when platelets were used on the 5th day of storage ($P=0.001$).

Conclusions: The study findings revealed that platelets have an efficient capacity to stimulate and activate monocytes. The possible involvement of molecules in the interaction of platelet-monocyte demand to be further studied in future.

Keywords: Monocyte; Platelet concentrate; Respiratory burst

This paper should be cited as:

Razavi Hosseini NS, Yari F, Aghaei A. *Effects of platelets on platelet concentrate product on the activation of human peripheral blood monocyte cells.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 23(11): 1116-26.

***Corresponding author: Tel: +982182052238, Email: f.yari@ibto.ir**