

مطالعه سطوح بیان گیرنده‌های چسبندگی پلاکتی در فراورده‌های پلاکتی تغلیظ شده از پلاسمای غنی از پلاکت

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۰۲ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۲/۱۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۲/۳۰

زمینه و هدف: Platelet receptor glycoprotein Iba (GPIIb) از کمپلکس رسپتوری GPIIb-IX-V و Platelet glycoprotein VI (GPVI) از جمله مهمترین گیرنده‌های پلاکتی هستند که در فرایند تشکیل لخته دخیل می‌باشند. GPIIb در شروع فرایند تشکیل لخته در شرایط جریان خون سرخرگی نقشی اساسی دارد در حالی که GPVI فارغ از میزان شدت جریان خون عروقی، در چسبندگی پایدار پلاکت‌ها دخالت می‌نماید. از آنجایی که افزایش زمان نگهداری تأثیرات سوئی بر عملکرد پلاکت‌ها دارد مطالعه الگوی بیان این گیرنده‌ها در طول نگهداری فراورده‌های پلاکتی از نظر کیفی واجد اهمیت می‌باشد.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۹۳ بر روی فراورده‌های پلاکتی حاصل از Platelet-rich plasma (PRP) تولیدی سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفته است. در این راستا پنج کیسه کنسانتره پلاکتی به مدت پنج روز نگهداری شدند و سطوح بیان GPIIb α و GPVI در آن‌ها برحسب مقادیر میانگین شدت فلورسانس با فلوسایتومتری سنجیده شد.

یافته‌ها: میزان بیان GPIIb α در روز اول (Mean fluorescence intensity, MFI= $87 \pm 5/9$) کاهش یافت ($P=0/0094$). بیان گیرنده GPVI نیز بر اساس MFI در روزهای یک، سه و پنج به ترتیب $20/6 \pm 3/3$ ، $24 \pm 2/5$ و $14 \pm 4/9$ بود که در روز پنجم نسبت به روز سوم با تفاوت معناداری کاهش یافت ($P=0/0213$).

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش معنادار سطوح بیان GPIIb α و GPVI در طول نگهداری پلاکت‌ها، به نظر می‌رسد که استفاده از فراورده‌های کهنه‌تر پلاکتی، اثرات سوئی را در عملکردهای چسبندگی و در نتیجه کارآیی پلاکت‌ها جهت مصارف بالینی به‌جای گذارد.

کلمات کلیدی: فعالیت پلاکتی، گیرنده چسبندگی، گلیکوپروتئین VI غشای پلاکتی، GPIIb α ، پلاسمای غنی از پلاکت، ترومبوز.

فاطمه نساجی

مهران قاسم‌زاده

زینب پیر محمد جماعت

احترام‌السادات حسینی*

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

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شیخ فضل‌الله نوری، تقاطع بزرگراه شهید همت، جنب برج میلاد، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون
تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۱۵۷۲-۳
E-mail: e.hosseini10@yahoo.com.au

مقدمه

پلاکت‌های خون، فراگمان‌های سلولی بدون هسته و کوچکی هستند که نقش اساسی در هموستاز بازی می‌کنند.^۱ جداسازی و نگهداری پلاکت‌ها می‌تواند همراه با افزایش برگشت‌پذیر و یا برگشت‌ناپذیر در سطوح پایه‌ای فعالیت پلاکتی باشد. در طب انتقال خون، صرف‌نظر از روش‌های رایج آزمایشگاهی در جداسازی، پلاکت‌ها به‌شکل شایعی تحت تأثیر فرایندی موسوم به "آسیب نگهداری پلاکت

(Platelet storage lesion)" قرار می‌گیرد. از عوامل دخیل در فرایند آسیب

نگهداری پلاکت فاکتورهای محیطی مانند زمان نگهداری پلاکت، دمای نگهداری، تعداد پلاکت نسبت به حجم فراورده، ترکیب محلول تأمین‌کننده انرژی و بافری کننده سیستم در کیسه و همچنین میزان نفوذپذیری ظرف نگهداری پلاکت به گازها می‌باشد.^۲ ابتدای فرایند آسیب نگهداری پلاکت همراه با تغییر شکل پلاکت از دیسکوئیدی به اسفروئیدی است که ناشی از افزایش جزئی در میزان کلسیم پایه داخل سلولی می‌باشد.^۳ شرایط نامطلوب و یا طولانی شدن زمان نگهداری،

هرچند گیرنده GPIIb/IIIa دارای نقش محوری در چسبندگی پلاکت‌ها در شرایط High shear می‌باشد اهمیت گیرنده چسبندگی GPVI با توجه به اینکه هم در شرایط High shear با همکاری GPIIb/IIIa و هم در شرایط Low shear (به‌صورت انحصاری) در چسبندگی پلاکت نقش دارد، اساسی و مضاعف خواهد بود.^۸ مجموعه GPIIb-V-IX از لحاظ فراوانی دومین گیرنده پلاکتی و متعلق به خانواده تکرارهای غنی از لوسین (LRR) می‌باشد^۹ این مجموعه شامل چهار زیرواحد می‌باشد که شامل GPV، GPIIb، GPIIb β ، GP IX است که همه چهار زیرواحد دارای یک نوع موتیف ساختاری توالی LRR خارج سلولی با موقعیت‌های لوسینی حفظ شده می‌باشند.^{۱۰}

GPIIb/IIIa (CD42b) بزرگ‌ترین و در عین حال مهمترین بخش کمپلکس است که در دومین خارج سلولی خود منطقه‌ای برای اتصال به vWF و ترومبین^{۱۱} و اینتگرین‌ها به‌خصوص اینتگرین لکوسیتی Mac-1 دارد.^{۱۲، ۱۳} GPIIb-V-IX علاوه بر وظیفه چسبندگی، به‌عنوان انتقال‌دهنده پیام نیز عمل می‌کند و این کار را با فعال کردن و افزایش تمایل اینتگرین α IIb β به لیگاند خود انجام می‌دهد،^۱ همچنین GPIIb/IIIa یک عامل تنظیم‌کننده بسیار قوی در بقای *in vivo* پلاکت‌ها می‌باشد، چرا که استفاده از آنتی‌بادی‌هایی که سبب القای کلاسترنینگ یا دایمریزه شدن این رسپتورها می‌گردند، سبب پاکسازی سریع آن‌ها از گردش خون می‌شوند،^{۱۴} همچنین در پی نگهداری پلاکت‌ها، قابلیت اتصال محکم آن‌ها به سطوح فعال (Reactive) کاهش می‌یابد که به‌طور عمده به‌دلیل اختلالات ساختاری رسپتور GPIIb-V-IX در حین نگهداری پلاکت به‌دلیل فعالیت متالوپروتئینازهای غشایی و کاهش بیان GPIIb/IIIa و GPV در این کمپلکس می‌باشد.^{۱۵}

GPVI (۶۵ کیلودالتون) یک عضو از خانواده بزرگ ایمونوگلوبولین‌ها و دارای دو دومین ایمونوگلوبولینی خارج سلولی، دومین شبه موسین و دومین ترانس ممبران و دم سیتوپلاسمیک است. مهمترین لیگاند فیزیولوژیکی آن کلاژن بوده و همچنین لامینین نیز به آن متصل می‌شود و از لیگاندهای غیرفیزیولوژیکی آن نیز می‌توان پپتید مرتبط با کلاژن (CRP)، کانولکسین، توکسین‌های مار، آلبرهاژین (Albrogagin) را نام برد.^۸ آگونیست‌ها می‌توانند کلاسترنینگ مولکول‌های GPVI موجود در سطح پلاکت را القا نموده و منجر به تجمع مولکول‌های سیگنالی در مجاورت همدیگر شوند.^{۱۶} پژوهش کنونی با هدف بررسی الگوی بیان گیرنده‌های GPVI و GPIIb/IIIa در خلال نگهداری پلاکت‌ها انجام گردید.

منجر به افزایش بیان شاخص‌های فعالیت پلاکتی همچون P-selectin و CD40L (که حاکی از افزایش برگشت‌ناپذیر فعالیت پلاکتی می‌باشند) خواهد شد.^۴

تغییرات ایجاد شده متأثر از آسیب نگهداری پلاکت در *in vivo* عبارتند از کاهش بقا، فعالیت هموستاتیک و ریکاوری پلاکت و در *in vitro* کاهش سطح گلوکز و pO₂ و pH، کاهش میانگین حجم پلاکت به‌علت فراگمانتاسیون یا تشکیل میکروپارتیکل، افزایش P-Sel و بیان CD63 در اثر آزادسازی α -گرانول‌ها، Externalization فسفاتیدیل سرین، افزایش بیان GPIIIa و GPIIb، CD41 و CD61، کلاسترنینگ زیرواحد GPIIb/IIIa، فعالیت کاسپاز شش و ماشین آپوپتوز، کاهش یون کلسیم و کاهش اتصال فیبرینوژن می‌باشد^۲ و در نهایت منتهی به شرایط آپوپتوتیک پلاکتی و از دست دادن رسپتورهای عملکردی از جمله GPIIb/IIIa همراه با آزاد شدن وزیکول‌ها منجر می‌شود که در پی آن می‌تواند اثرات سوئی در بقا و عملکرد بهینه این سلول‌ها پس از تزریق فرآورده را ایجاد نمایند.^۳ علاوه بر مولکول‌های سطحی یاد شده، مطالعات علوم پایه همچنین بیانگر کاهش میزان بیان گیرنده چسبندگی Platelet glycoprotein VI (GPVI) به‌دنبال افزایش فعالیت و آپوپتوز پلاکت‌ها است.^{۵، ۶}

از آنجایی که مطالعات انجام شده گویای ارتباط مستقیم مابین بیان گیرنده GPVI با گیرنده‌های CD62P و GPIIb/IIIa است^۷ بنابراین به‌نظر می‌رسد در خلال نگهداری فرآورده‌های پلاکتی، متأثر از فرایند آسیب نگهداری پلاکت، تغییرات در بیان گیرنده GPVI را نیز شاهد باشیم. به‌خصوص اینکه مطالعات انجام شده حاکی از ارتباط آپوپتوز با ریزش GPVI به‌دنبال فعال شدن کاسپاز و متالوپروتئینازها نیز می‌باشد که در این رابطه نظر به اینکه نگهداری پلاکت در زمان‌های طولانی می‌تواند مسیرهای یاد شده را فعال نماید به‌احتمال منجر به افزایش ریزش گیرنده GPVI نیز خواهد گشت.^۵

به‌دنبال آسیب عروقی، میانکنش بین گیرنده GPIIb/IIIa با مجموعه vWF-کلاژن ماتریکس تحت عروقی و GPVI با کلاژن، نقش اولیه و اساسی در چسبندگی پلاکت و شروع فرایند ترومبوس را ایفا می‌نماید، به‌علاوه اتصال هر دو این گیرنده‌ها به لیگاندهای مربوطه منجر به القای فعالیت مسیرهای انتقال پیامی (Inside-out) می‌گردد که در نهایت با فعال‌سازی اینتگرین اصلی پلاکت α IIb β و اتصال آن به فیبرینوژن موجبات تجمع پلاکتی و توسعه و پایداری لخته را فراهم خواهد نمود.

روش بررسی

ایزوتایپ کنترل FITC Mouse IgG1 Isotype Control Antibody (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) و یا آنتی‌بادی ضد FITC Mouse Anti-human CD42b, BD GPIIb/IIIa (Biosciences San Jose, CA, USA) و یا آنتی‌بادی ضد P-selectin (Anti-human CD62Pm, BD Biosciences San Jose, CA, USA) و در حضور و یا عدم حضور آگونیست‌های Thrombin Receptor Activating Peptide, TRAP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) با غلظت نهایی دو میکرومولار (جهت ایجاد پلاکت‌های تحریک شده و مطالعه پاسخ پلاکت به تحریکات آگونیستی) و یونوفور کلسیم A23187 و Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) با غلظت نهایی ۵ و ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب جهت دسترسی به بالاترین سطح فعالیت و آپوپتوز پلاکتی، به مدت حداقل ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه گردیده و پس از طی زمان انکوباسیون پلاکت‌ها با پارافرمالدهیدید ۲٪ فیکس گردید. در نهایت توسط PAS II flow cytometer (Partec GmbH, Munster, Germany) و توسط FlowJo software, version 7.6.2 (TreeStar, Ashland, OR, USA) مورد خوانش و آنالیز قرار گرفتند.

جهت اندازه‌گیری میزان بیان GPVI، ابتدا به لوله‌های آزمایش حاوی نمونه پلاکتی، آنتی‌بادی Anti-human GPVI purified Clone (Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) با غلظت نهایی اضافه شد (۰/۵ µg/ml) و به‌جز لوله‌های پلاکت تنها، کنترل ایزوتایپ و نمونه مختص آنتی‌بادی ثانویه. در صورت نیاز با مواجهه با آگونیست‌ها و مواد شیمیایی، یونوفور کلسیم A23187، CCCP، TRAP (با غلظت‌های پیش‌گفته) و کلاژن (۱۰ µg/ml) به نمونه‌ها اضافه گردید.

به‌دنبال آن به مدت ۴۵ دقیقه در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون اول، تمام لوله‌ها شسته شدند و تکمه پلاکتی باقیمانده توسط تاپرود سوسپانسیون دوباره شده و پس از اتمام فرایند شستشو آنتی‌بادی ثانویه FITC Mouse Anti-Human IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) را اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد.

شایان ذکر است که لوله کنترل ایزوتایپ با اضافه نمودن FITC Mouse IgG1 Isotype control، بدون آنتی‌بادی‌های اختصاصی در نظر گرفته شد. در اینجا نیز پارافرمالدهیدید به‌عنوان فیکساتور پلاکتی عمل

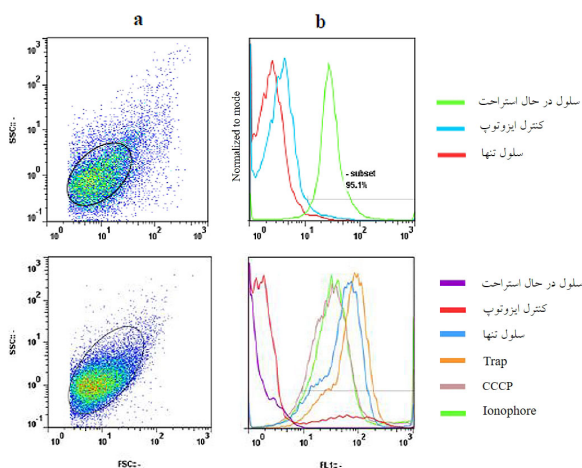
مطالعه انجام‌شده از نوع تجربی بوده و جامعه مورد مطالعه، کنسانتره‌های پلاکتی حاصل از PRP و کیسه‌های خون کامل بود که از پایگاه مرکزی انتقال خون استان تهران تهیه و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات منتقل شد. این مطالعه از نیمه دوم سال ۱۳۹۳ تا اوایل سال ۱۳۹۴ به انجام رسیده است. نمونه‌گیری در جمعیت نرمال و به‌صورت تصادفی انجام شده است. پنج کیسه، پلاکت‌های کنسانتره رندوم، که از نظر میزان بیان مولکول‌های GPIIb/IIIa و GPVI در روزهای اول، سوم و پنجم مورد مطالعه قرار گرفتند. به‌علاوه از پنج کیسه خون کامل نیز پلاکت جدا شد که به‌عنوان کنترل (جهت ارزیابی رعایت شرایط استاندارد در تهیه فرآورده پلاکتی) مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش برای تهیه پلاکت کنترل مرجع، ابتدا کیسه خون به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. سپس در دور سبک ۳۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و پلاسما سرشار از پلاکت (PRP) از رسوب RBC جدا گردید. در مرحله بعد در دور ۱۷۰۰ g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شده و پلاسما رویی را برداشته و تکمه پلاکتی در محلول تایرود حاوی یک میلی‌مولار کلرید کلسیم و ۰/۰۲ U/ml Apyrase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) سوسپانسیون دوباره گردید.

نمونه‌های پلاکتی مطابق شرایط استریل آزمایشگاهی، توسط دستگاه متصل‌کننده کیسه‌های خون به شکل استریل TSCD® II Sterile Tubing (Welder (Terumo BCT, Inc., Lakewood, CO, USA) به سه قسمت به‌طور تقریبی مساوی تقسیم شد به‌نحوی که فرآورده پلاکتی از طریق کورد به درون کیسه‌های اقماری (Jms North America Corp Hayward, CA, USA) منتقل گردید و کوردها توسط سیلر برقی (Terumo Teruflex ACS-152 Tube Sealer, Lab & Life Science, CA, USA) مسدود شد و تا زمان آزمایش در اُزیتاتور پلاکتی انکوباتور در دمای ۲۵ °C نگهداری گردیدند. نمونه‌های حاصل از این سه بخش در روزهای متوالی یک، سه و پنج پس از نگهداری بررسی شدند.

فرآورده PRP را با دور ۱۷۰۰ g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ کرده و پلاسما رویی فاقد پلاکت (PPP) دور ریخته و سپس رسوب پلاکتی را سوسپانسیون دوباره کردیم. برای فلوسایتومتری سوسپانسیون پلاکتی با شمارش $3 \times 10^7/ml$ تهیه گردید. در لوله‌های ایندرف پلاکت‌ها با آنتی‌بادی

در حال استراحت و به دنبال تیمار با آگونیست‌های مختلف (Trap, Ionophore, CCCP, Analiz گردید (نمودار ۱). میانگین میزان بیان GPVI نیز در روز تهیه نمونه کنترل، بر حسب MFI، $23 \pm 4/03$ بود (Mean \pm SD). گیت پلاکتی نمونه کنترل در فلوسایتومتری مشخص شد و بیان GPVI در حال استراحت آنالیز گردید (نمودار ۲-ب). نمودار بافتی ۲-ج نتایج حاصله از پاسخ پلاکت‌های تیمار شده با آگونیست‌ها و مواد شیمیایی مختلف مانند TRAP، CCCP، یونوفور کلسیم (A23187) و کلاژن را نشان می‌دهد. همچنین بیان رسپتورهای بیان شده را در روز اول در دو حالت (بدون تحریک آگونیستی و متعاقب تیمار با آگونیست‌های مختلف) مورد بررسی قرار دادیم که مشخص گردید نتایج پاسخ به آگونیست‌های مختلف همانند نمونه‌های کنترل بوده است.

با استفاده از MFI میزان بیان GPIba در روز اول ($86 \pm 5/9$) نشان داده شد (Mean \pm SD) که در روز سوم به علت از دست دادن رسپتور GPIba (ریزش و یا میکروپارتیکلیشن) به میزان ($69 \pm 7/9$) کاهش یافت هرچند معنادار نبود. در روز پنجم نیز نسبت به روز سوم این کاهش ادامه یافت ($61 \pm 7/7$) که البته تفاوت معنادار نبود، ولیکن به طور کلی از روز ۱ تا ۵ با کاهش معناداری با $P=0/0094$ روبرو بودیم (نمودار ۳-الف).



نمودار ۱: الف) نمودارهای پراکندگی (a) و بافتی (b) بیان گیرنده GPIba. ب) نمودار بافتی میزان بیان GPIba در روز اول نگهداری در پلاکت در حال استراحت و پلاکت تحریک شده با آگونیست‌ها

کرده و سبب توقف واکنش‌ها می‌گردد. محتویات لوله‌ها را جهت بررسی میزان بیان GPVI در پلاکت‌ها توسط فلوسایتومتری بررسی گردیدند. در فلوسایتومتری ابتدا جمعیت پلاکتی توسط پلاکت‌های رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی علیه CD42b (گیرنده GPIba) مشخص گردید و به منظور اطمینان از عملکردی بودن پلاکت‌ها، بیان پایه P-selectin پلاکت در فرآورده‌های روز اول و همچنین میزان بیان این رسپتور در پاسخ به آگونیست‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

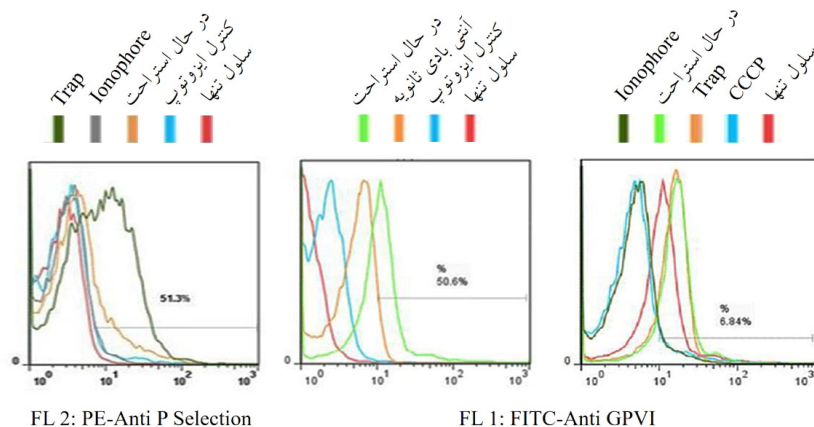
در این خصوص به دنبال انکوباسیون پلاکت‌ها با آنتی‌بادی منوکلونال ضد گیرنده GPIba (کونژوگه شده با FITC) و استفاده از تکنیک فلوسایتومتری علاوه بر تشخیص جمعیت پلاکتی (نمودار ۱-الف)، در ادامه کار، نحوه پاسخ‌دهی پلاکت‌ها در روز اول نگهداری به آگونیست‌های Trap، CCCP، Ionophore (نمودار ۱-ب) نیز مورد بررسی قرار گرفت. میزان انحراف نمودار بیان GPIba از نمودار ایزوتایپ کنترل بیانگر میزان بیان رسپتور در نمونه در حال استراحت می‌باشد. نمودار ۲-الف میزان بیان P-selectin در نمونه پلاکت تیمار شده با آگونیست‌های TRAP و Ionophore را در مقایسه با میزان آن در نمونه پلاکتی در حال استراحت در روز اول نشان می‌دهد.

آنالیز داده‌های فلوسایتومتری از طریق محاسبه درصد (Percentage of gated) جهت مطالعه بیان رسپتور P-selectin و میانگین شدت فلورسانس (Mean fluorescence intensity, MFI) جهت مطالعه بیان رسپتورهای GPIba و GPVI انجام پذیرفت.

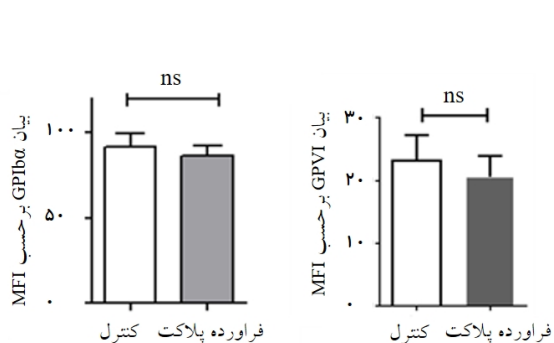
در این مطالعه به منظور تحلیل داده‌ها از Graphpad Prism version 6.07 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) استفاده گردید. برای مقادیر خام هر گروه میانگین و انحراف معیار محاسبه شد و برای مشخص کردن منشأ تفاوت احتمالی بین سه نمونه (روز ۱، ۳ و ۵) از روش آنالیز آماری Kruskal-Wallis همراه با Dunn's multiple comparison test استفاده شد. در این مطالعه حصول مقادیر $P < 0/05$ به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

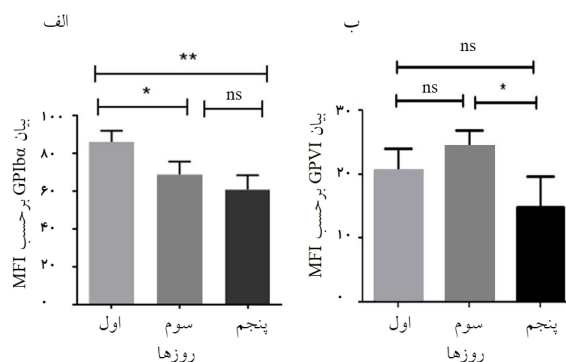
در محدوده انتخاب شده جمعیت پلاکتی، میانگین میزان بیان GPIba در روز تهیه نمونه کنترل، بر حسب MFI، $91 \pm 8/3$ بود (Mean \pm SD). در این آزمایشات میزان بیان GPIba در نمونه کنترل،



نمودار ۲: الف) بیان P-selectin در نمونه پلاکتی در حال استراحت در روز اول و در پاسخ به آگونیست‌ها، ب) بیان GPVI در پلاکت‌های در حال استراحت، ج) بیان آن در پاسخ به آگونیست‌ها



نمودار ۴: مقایسه بیان GPIIb/IIIa و GPVI در فرآورده پلاکتی روز اول و نمونه پلاکتی کنترل
ns. معنادار نمی‌باشد (No significant)



نمودار ۳: تغییرات بیان GPIIb/IIIa (الف) و GPVI (ب) در حین نگهداری پلاکت
ns. معنادار نمی‌باشد (no significant), * اختلاف با $P < 0.05$ معنادار می‌باشد، ** اختلاف با $P < 0.01$ معنادار می‌باشد.

مطالعات آماری نشان داد که با استفاده از داده‌های MFI در روز اول تفاوت معناداری از نظر بیان GPIIb/IIIa و GPVI بین نمونه‌های پلاکت با انتخاب تصادفی (راندم) با نمونه کنترل، وجود ندارند (نمودار ۴).

بحث

بر اساس بررسی‌های به‌عمل آمده بر روی فرآورده‌های پلاکتی،

در فرآورده پلاکتی کنسانتره، سطوح بیان گیرنده GPVI بر حسب MFI در روزهای یک، سه و پنج به ترتیب $(20/6 \pm 3/3)$ ، $(24/3 \pm 2/5)$ و $(14/8 \pm 4/9)$ بود (Mean \pm SD). همان‌طور که در نمودار ۳-ب دیده می‌شود، بررسی نمونه‌ها نشان می‌دهد که بیان گیرنده در روز سوم نگهداری نسبت به روز اول افزایش یافته است که معنادار نمی‌باشد ($P=0/766$). به دنبال آن بیان گیرنده در روز پنجم نسبت به روز سوم با تفاوت معناداری کاهش می‌یابد ($P=0/0213$).

بر اتصال پلاکت‌های نگهداری شده به ماتریکس کلاژنی است، حاکی از یافته‌های متضادی است.

مطالعاتی که اولین بار توسط Boomgaard و همکارانش انجام شد می‌تواند به‌طور غیرمستقیم داده‌هایی از نحوه بیان GPVI را در طول نگهداری پلاکت در اختیار ما قرار دهد. این پژوهش‌گران نشان داده‌اند که ظرفیت چسبندگی پلاکت به کلاژن تا روز سوم نگهداری ثابت است و تا روز هفتم نگهداری به‌طور تقریبی تا ۸۰٪ میزان اولیه، کاهش می‌یابد. ایشان همچنین نشان داده‌اند که ظرفیت چسبندگی پلاکتی به ماتریکس ساب اندوتلیال (SEM) تا روز سوم به‌میزان ۷۵٪ روز اول کاهش یافته که تا روز هفتم با کاهش بیشتر و به ۴۵٪ بیشتر از مقدار اولیه رسید. افزون بر این، پژوهش‌گران همچنین نشان داده‌اند که پاسخ‌های اگریگیشن و چسبندگی پلاکتی نیز در فرآورده‌ها، به‌دنبال نگهداری کاهش می‌یابد. با توجه به مطالعه به‌عمل آمده توسط این گروه به‌نظر می‌رسد، ظرفیت عملکردی مولکول GPVI به‌عنوان گیرنده اصلی کلاژن پس از نگهداری دستخوش کاهش چشمگیر گردد.^{۲۵}

در مقابل مطالعه‌ای که توسط Tynngård و همکارانش انجام شده است، به‌طور غیرمستقیم می‌تواند نشان‌دهنده افزایش عملکرد گیرنده GPVI در خلال نگهداری پلاکت باشد. در مطالعه این گروه، میزان چسبندگی پلاکت‌ها به بیدهای (Beads) پوشیده شده از فیبرینوژن و کلاژن در خلال نگهداری فرآورده‌های پلاکتی با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت که گویای افزایش معنادار چسبندگی به بیدهای گفته‌شده به‌ترتیب تا روز ۱۲ و هفت نگهداری بوده است. این مطالعه به‌طور غیرمستقیم می‌تواند گویای آن باشد که بیان و یا فعالیت چسبندگی گیرنده GPVI در خلال نگهداری افزایش می‌یابد.^{۲۶} بررسی‌های ما افزایش میزان بیان GPVI در روز سوم نسبت روز اول نگهداری را نشان داد که البته پس از آنالیز آماری مشخص گردید که افزایش بیان‌شده معنادار نبوده است. به‌دنبال آن در روز پنجم نگهداری، کاهش چشمگیری در میزان بیان گیرنده حاصل گردید که به‌احتمال می‌تواند به‌دلیل ریزش خارج غشایی و یا کاهش سطح سلولی به‌واسطه میکروپارتیکولاسیون باشد. جالب توجه است که نتایج پژوهش کنونی متفاوت از پژوهش‌های انجام شده در خصوص دیگر گیرنده چسبندگی پلاکتی، GPIIb/IIIa، است که از روز اول تا روز سوم و پنجم به‌طور مداوم کاهش می‌یابد.^{۲۷، ۲۱-۲۳} به‌نظر می‌رسد در

افزایش فعالیت پلاکتی و تغییرات زیان‌آور ایجاد شده در ساختار پلاکت‌ها و عملکرد آن‌ها حین نگهداری، امری غیرقابل اجتناب می‌باشد که این فرایند تحت عنوان آسیب نگهداری پلاکت (Platelet storage lesion) تعریف می‌گردد.^۴ علاوه بر مارکرهای فعالیتی P-selectin و CD40L که در منابع فراوانی از آن‌ها به‌عنوان شاخص‌های معتبر ارزیابی فرایند آسیب نگهداری پلاکت یاد شده است،^{۱۹، ۱۸} میزان بیان گیرنده چسبندگی GPIIb/IIIa در حین نگهداری فرآورده پلاکتی نیز در بیشتر این مطالعات به‌عنوان یکی دیگر از شاخص‌های ارزیابی آسیب نگهداری پلاکت مورد توجه قرار گرفته است.^{۲۰}

مطالعه میزان بیان GPIIb/IIIa در فرآورده پلاکتی دارای سابقه طولانی است که کماکان در سال‌های اخیر نیز پژوهش‌های زیادی انجام یافته است که از جمله آن‌ها مطالعات Sandgren, Albanyan, و Ostrowski می‌باشد که همگی گویای کاهش میزان بیان GPIIb/IIIa (MFI) همراه با افزایش بیان سایر مارکرهای فعالیتی پلاکتی همچون P-selectin, CD40L, PS در حین نگهداری پلاکت در انواع فرآورده‌های پلاکتی تولیدی می‌باشند.^{۲۱-۲۳}

هم‌راستا با کلیه مطالعات انجام شده، در پژوهش کنونی نیز ارزیابی‌های به‌عمل آمده حاکی از آن بود که در طی پنج روز نگهداری فرآورده‌های گفته‌شده، میزان بیان GPIIb/IIIa با توجه به مقادیر MFI حاصله، متناسب با طول دوره نگهداری کاهش یافته است، به گونه‌ای که میزان بیان این رسپتور در روز سوم در مقایسه با روز اول و همچنین در روز پنجم نسبت به روز اول به‌شکل معناداری کاهش یافت.

مطالعه ما همچنین نشان داد که میزان بیان رسپتور GPIIb/IIIa (MFI) در روزهای اول با نمونه کنترل تولید شده تفاوتی نداشته است که این امر بیانگر کیفیت مطلوب فرآورده‌های پلاکتی روز اول از نظر پایین بودن سطح فرایند آسیب نگهداری پلاکت می‌باشد. لازم به یادآوری است مطالعات نشان داده‌اند، افزایش مارکرهای تشخیصی فعالیت پلاکتی P-selectin و CD40L در کنار کاهش بیان رسپتور GPIIb/IIIa می‌باشد که در مطالعه اخیر نیز بدان اشاره گردیده است.^{۲۴، ۲۲، ۲۱}

هرچند گیرنده GPVI را نیز می‌توان به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی فعالیت پلاکتی در نظر گرفت، تاکنون بررسی مستقیمی از میزان بیان گیرنده یاد شده در حین نگهداری پلاکت در دسترس نمی‌باشد و معدود مطالعات غیرمستقیم انجام شده که مبتنی

پلاکت است. به علاوه با توجه به نقش محوری گیرنده GPVI در فرایند چسبندگی پلاکتی و تشکیل لخته به ویژه در شرایط Shear پایین، به نظر می رسد کاهش بیان این گیرنده در فرآورده ها در طی نگهداری به طور قطع اثرات سوئی در کارایی پلاکت های مورد استفاده خواهد داشت.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مطالعه سطوح بیان و Shedding مولکول های Adhesive و Proinflammatory پلاکتی در فرآورده های پلاکت راندوم تولیدی سازمان انتقال خون" مصوب مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون در سال ۱۳۹۰ به کد ۱۴۹۶-۳۳-۰۱-۱۳۹۰ می باشد که با حمایت آن موسسه اجرا شده است. همچنین همکاری های مجدانه پایگاه انتقال خون استان تهران به خصوص سرکار خانم فاطمه عباسی نیز شایان تقدیر است. نویسندگان همچنین از زحمات خانم مهندس مریم السادات طاهری تشکر می نمایند.

خصوص گیرنده GPVI، میزان افزایش بیان در روزهای اول نگهداری به شکلی جبران کننده فرایند ریزش گیرنده بیان شده است که بر ایند آن ها کماکان می تواند توأم با عدم کاهش و یا حتی افزایشی جزئی در بیان گیرنده باشد. از طرفی این احتمال نیز وجود دارد که میزان ریزش گیرنده GPVI در روزهای اول کمتر از GPIIb باشد به طوری که نمی تواند منجر به کاهش بیان گیرنده یاد شده در سطحی که در گیرنده GPIIb مشاهده گردید، شود.

به طور کلی پژوهش کنونی ارزیابی جامعی را از تغییرات فنوتیپی و بیان گیرنده های GPIIb و GPVI در پلاکت های تولیدی سازمان انتقال خون حین ذخیره سازی ارایه نموده است که نشان دهنده کاهش بیان معنادار گیرنده های گفته شده در طی پنج روز نگهداری فرآورده می باشد. لازم به یادآوری است، از آنجا که این مطالعه برای اولین بار به بررسی شاخص های مرتبط با گیرنده GPVI پرداخته، منحصر به فرد بوده و همچنین تکمیل کننده سایر مطالعات مرتبط با فرایند آسیب نگهداری

References

- Hosseini E, Ghasemzadeh M. Different Stages of Platelet Adhesion to the Site of Vascular Injury. *IJBC* 2012;4(3):133-42.
- Ohto H, Nollt KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2011;44(3):321-5.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010;116(12):2011-8.
- Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009;41(2):105-13.
- Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, Hua M, Qiao J, White MJ, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopeny that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* 2011;118(6):1663-74.
- Gardiner EE, Andrews RK. Platelet receptor expression and shedding: glycoprotein Ib-IX-V and glycoprotein VI. *Transfus Med Rev* 2014;28(2):56-60.
- Bigalke B, Langer H, Geisler T, Lindemann S, Gawaz M. Platelet glycoprotein VI: a novel marker for acute coronary syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2007;33(2):179-84.
- Andrews RK, Karunakaran D, Gardiner EE, Berndt MC. Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(7):1511-20.
- Ikeda Y, Handa M, Murata M, Goto S. A new approach to antiplatelet therapy: inhibitor of GPIIb/IIIa-vWF interaction. *Haemostasis* 2000;30 Suppl 3:44-52.
- Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 1998;17(1):1-19.
- Kaplan ZS, Zarpellon A2, Alwis I3, Yuan Y1, McFadyen J1, Ghasemzadeh M4, et al. Thrombin-dependent intravascular leukocyte trafficking regulated by fibrin and the platelet receptors GPIIb and PAR4. *Nat Commun* 2015;6:7835.
- Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost* 2015;113(6):1224-35.
- Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* 2013;131(3):191-7.
- Bergmeier W, Burger PC, Piffath CL, Hoffmeister KM, Hartwig JH, Nieswandt B, et al. Metalloproteinase inhibitors improve the recovery and hemostatic function of in vitro-aged or -injured mouse platelets. *Blood* 2003;102(12):4229-35.
- Bergmeier W, Piffath CL, Cheng G, Dole VS, Zhang Y, von Andrian UH, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/IIIa shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res* 2004;95(7):677-83.
- Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102(2):449-61.
- Ghasemzadeh M, Kaplan ZS, Alwis I, Schoenwaelder SM, Ashworth KJ, Westein E, et al. The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. *Blood* 2013;121(22):4555-66.
- Mehrpoori M, Hosseini E, Amini Kafi-Abad S. The effect of pre-storage leukoreduction on the levels of expression and shedding of the pro-inflammatory molecule P-Sel in random PRP platelets. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2015;12(2):153-62.
- Sharifrazi M, Ghasemzadeh M, Saraf Kazerooni E, Hosseini E. The effect of pre-storage leukoreduction on the levels of expression of the pro-inflammatory molecule CD40 ligand in random PRP platelets. *Razi J Med Sci* 2015. [In press]
- Hillyer CD, Silberstein LE, Ness PM, Anderson KC, Roback JD. *Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles and Practice*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2007.
- Sandgren P, Callaert M, Shanwell A, Gulliksson H. Storage of platelet concentrates from pooled buffy coats made of fresh and overnight-stored whole blood processed on the novel Atricus 2C+ system: in vitro study. *Transfusion* 2008;48(4):688-96.

22. Albanyan AM, Harrison P, Murphy MF. Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis- and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. *Transfusion* 2009;49(1):108-17.
23. Ostrowski SR, Bochsén L, Salado-Jimena JA, Ullum H, Reynaerts I, Goodrich RP, et al. In vitro cell quality of buffy coat platelets in additive solution treated with pathogen reduction technology. *Transfusion* 2010;50(10):2210-9.
24. Tynngård N, Studer M, Lindahl TL, Trinks M, Berlin G. The effect of gamma irradiation on the quality of apheresis platelets during storage for 7 days. *Transfusion* 2008;48(8):1669-75.
25. Boomgaard MN, Gouwerok CW, Homburg CH, de Groot G, IJsseldijk MJ, de Korte D. The platelet adhesion capacity to subendothelial matrix and collagen in a flow model during storage of platelet concentrates for 7 days. *Thromb Haemost* 1994;72(4):611-6.
26. Tynngård N, Wallstedt M, Södergren AL, Faxälv L, Ramström S. Platelet adhesion changes during storage studied with a novel method using flow cytometry and protein-coated beads. *Platelets* 2015;26(2):177-85.
27. Metcalfé P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, Swann I, Ouwehand WH, Goodall AH. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol* 1997;98(1):86-95.

The expression levels of platelet adhesive receptors in PRP derived platelet concentrates during storage

Fatemeh Nassaji M.Sc.
Mehran Ghasemzadeh Ph.D.
Zeynab Pirmohammad Jamaat
M.Sc.
Ehteramolsadat Hosseini Ph.D.*

Blood Transfusion Research Center,
High Institute for Research and
Education in Transfusion Medicine,
Tehran, Iran.

* Corresponding author: Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Organization Building, Hemmat Express Way, Next to the Milad Tower, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 88601572-3
E-mail: e.hosseini10@yahoo.com.au

Abstract

Received: 23 Nov. 2015 Revised: 03 May 2016 Accepted: 18 May 2016 Available online: 19 May 2016

Background: Major platelet adhesive receptors that contribute significantly to thrombus formation include platelet receptor glycoprotein Iba (GPIb α) of the GPIb-IX-V complex and platelet glycoprotein VI (GPVI). GPIb α plays a crucial role in platelet tethering to sub-endothelial matrix, which initiates thrombus formation at arterial shear rates, whereas GPVI is critically involved in platelets firm adhesion to the site of injury regardless of shear condition. During storage, platelets experience some changes that deleteriously affect the expression levels of platelet receptors, which in turn can alter platelet functional behaviors. Considering the important roles of GPIb α and GPVI in platelet adhesion, it seems that any dramatic changes in the expression levels of these receptors can influence adhesive function of transfused platelets. Thereby examining GPIb α and GPVI expression during the storage of platelet concentrates may provide some useful information about the functional quality of these products after transfusion.

Methods: In our experimental study, 5 PRP-platelet concentrates were randomly obtained from Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO). All the platelet products met the standard quality assessment based on AABB (American Association of Blood Banks) guidelines. Washed platelets were subjected to flowcytometry analysis for the evaluation of GPIb α and GPVI receptor expression in day 1, 3 and 5 after storage. Data were presented as mean fluorescence intensity (MFI) and analyzed by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

Results: The GPIb α expression on first day (MFI=86 \pm 5.9) was reduced three days after storage (MFI= 69 \pm 6.9). The expression levels continued to reduce until day 5 in which GPIb α expression was markedly decreased to (MFI= 61 \pm 7.7) (P= 0.0094). GPVI expression on the days 1, 3 and 5 after storage were 20.6 \pm 3.3, 24 \pm 2.5 and 14 \pm 4.9, respectively. The results showed a significant decrease of expression on day 5, compared to that in day 3 after storage (P= 0.0213).

Conclusion: Our study showed significant decreases in the expression of platelet receptors GPIb α and GPVI after 5 days storage, suggesting a major defect in adhesive function of platelets during this term.

Keywords: adhesion receptor, GPIb α , platelet activation, platelet membrane glycoprotein VI, platelet-rich plasma, thrombosis.