کاهش سطوح بیان رسپتور پلاکتی GPIbα به‌واسطه ریزش خارج غشایی در فرآورده‌های پلاکتی تغلیظ شده از پلاسمای غنی از پلاکت

زینب پیر محمد جماعت
احترام السادات حسینی
مهران قاسم‌زاده*

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

دریافت: ۱۳۹٤/۰۸/۱۹ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۵/۰٤/۰٤ آنلاین: ۱۳۹۵/۰٤/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: شواهد بارزی از فعالیت ناخواسته پلاکت‌ها در طی نگهداری وجود دارد که می‌تواند منجر به افزایش بیان و ریزش رسپتورهای عملکردی آن‌ها از جمله GPIbα و در نهایت آسیب‌های دوران نگهداری پلاکت‌ها گردد. هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان و ریزش رسپتور GPIbα در حین نگهداری فرآورده پلاکتی کنسانتره می‌باشد.

روش بررسی: مطالعه حاضر به صورت تجربی از شهریور ماه سال ۱۳۹۳ تا ابتدای سال ۱۳۹٤ با بررسی فرآورده‌های پلاکتی حاصل از Platelet-rich plasma (PRP) در سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفته است. سطوح بیان GPIbα در کنسانتره پلاکتی حاصل از PRP با تکنیک فلوسایتومتری و میزان ریزش این مولکول متعاقب اولتراسانتریفوژ با استفاده از تکنیک وسترن بلات در روزهای یک، سه و پنج پس از ذخیره سازی سنجیده و مقایسه شد.

یافته‌ها: میزان بیان GPIbα در روز اول نگهداری (Mean fluorescence intensity, MFI= ۸٦±۵/۹) بود که تا روز پنجم به شکل معناداری کاهش یافت (P=۰/۰۰۹٤) و به سطح بیان (MFI= ٦۱±۷/۷) رسید. همچنین مقادیر به‌دست آمده از GPIbα محلول (گلیکوکالیسین) در روز اول (۰/۳+۰/۳۱)، سوم (۰/٦+۱/۰٦) و پنجم (۰/٤+۱/۵)، حاکی از افزایش معنادار ریزش این رسپتور با (P=۰/۰۰۹۸) در روز اول نسبت به روز پنجم می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به میزان کاهش معنادار سطوح رسپتور عملکردی GPIbα پلاکت‌ها در طول نگهداری، به نظر می‌رسد که نگهداری فرآورده‌های پلاکتی به‌خصوص تا روز پنجم کارایی آنها را جهت مصارف بالینی کاهش دهد ضمن اینکه تزریق فراورده‌ای با مقادیر بالای GPIbα محلول نیز ممکن است منجر به عوارض پیش التهابی و اختلال چسبندگی گردد.

کلمات کلیدی: فعالیت پلاکتی، گلیکوکالیسین، GPIbα، پلاسمای غنی از پلاکت، ترمبوز.

* نویسنده مسئول: بزرگراه شیخ فضل‌اله نوری، تقاطع بزرگراه شهید همت، جنب برج میلاد، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.
تلفن:۳-۸۸٦۰۱۵۷۲-۰۲۱
E-mail: mehran1476@yahoo.com

مقدمه

فرایند آسیب دوران نگهداری پلاکت‌ها (Platelet storage lesion) در ارتباط با کاهش Recovery و بقا و همچنین کاهش فعالیت‌های هموستاتیک پلاکت در شرایط In vivo و به‌دنبال انتقال پلاکت می‌باشد.[1] ابتدای این فرایند همراه با از دست دادن شکل مورفولوژیک دیسکوییدی پلاکت ناشی از افزایش جزیی در میزان کلسیم پایه‌ی داخل سلولی می‌باشد[2و3] که به واسطه‌ی شرایط نامطلوب و یا طولانی شدن زمان نگهداری، منجر به افزایش بیان مارکرهای فعالیت پلاکتی همچون P-selectin و CD40L (که حاکی از افزایش برگشت‌ناپذیر فعالیت پلاکتی می‌باشند) خواهد شد.[4] در این میان کمپلکس GPIb-V-IX که متشکل از چهار زیرواحد گلیکوپروتیینی مجزا (GPIbα، GPIbαβ، GPV و GPIX) می‌باشد نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. این رسپتور که نقشی اساسی در هموستاز

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

اولیه بازی می‌کند، اتصال پلاکت‌های در حال گردش به محل جراحت عروق سرخرگی را از طریق واکنش GPIbα با vWF ساکن روی رشته‌های کلاژنی ماتریکس تحت اندوتلیال، با وجود شدت جریان بالای خون موجود در شریان‌ها تامین می‌نماید.[۵] همچنین GPIbα یک عامل تنظیم‌کننده بسیار قوی در بقای In vivo پلاکت‌ها[۶] و از لیگاندهای مهم اینتگرین‌ها به‌ویژه اینتگرین لکوسیتی Mac-1 است که به این واسطه در فرایندهای التهابی پس از تشکیل لخته نیز نقش دارد.[۷و۸]

به‌دنبال نگهداری پلاکت‌ها، قابلیت اتصال محکم آنها به سطوح فعال (Reactive) کاهش می‌یابد که عمدتاً به دلیل افزایش فعالیت متالوپروتیینازهای غشایی و کاهش بیان GPIbα و GPV در این کمپلکس می‌باشد.[۹] برش پروتئولیتیک رسپتوری توسط متالوپروتیینازهای غشایی، به‌اصطلاح Shedding یا ریزش رسپتوری نامیده می‌شود که در خصوص GPIbα عموماً با میانجیگری آنزیم ADAM17 متعاقب فعالیت پلاکتی، پیر شدن پلاکت‌ها و یا مواجهه آنها با مواد القاکننده‌ی آپوپتوز که میتوکندری را مورد هدف قرار می‌دهند (مانند: CCCP Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) رخ می‌دهد.

دومین خارج سلولی GPIbα که متعاقب ریزش به صورت محلول در محیط پراکنده می‌شود، گلیکوکالیسین نام دارد که میزان فزاینده‌ی آن در حین ذخیره‌ی پلاکت‌ها گزارش شده است.[۱۰] با توجه به اهمیت ریزش رسپتور GPIbα در فرایندهای مرتبط با بقا و کلیرانس پلاکت، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی میزان و الگوی بیان و ریزش رسپتور یاد شده در حین نگهداری پلاکت‌های تولیدی پایگاه سازمان انتقال خون تهران انجام گردید.

روش بررسی

مطالعه انجام شده 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 ۱۳۹٤ به انجام رسیده است. نمونه‌گیری در جمعیت نرمال و به صورت تصادفی انجام شده است. در این مطالعه در مجموع پنج کیسه از پلاکت‌های متراکم استفاده شد. همچنین از پنج کیسه خون کامل نیز پلاکت جدا شد که به‌عنوان کنترل (جهت ارزیابی رعایت شرایط استاندارد در تهیه فراورده پلاکتی) مورد مطالعه قرار گرفت.

نمونه‌های پلاکتی مطابق شرایط استریل آزمایشگاهی با استفاده از دستگاه متصل کننده کیسه‌های خون (Terumo sterile tubing welder tscdii) به شکل استریل، به سه قسمت تقریبا مساوی تقسیم و به سه کیسه‌ی اقماری منتقل شدند. در انتهای کار کورد هر کیسه توسط سیلر برقی (Tube sealer ACS-152) مسدود گردید. نمونه‌های حاصله برای مطالعات روزهای اول، سوم و پنجم استفاده گردیدند.

ابتدا شمارش پلاکت‌های فراورده را توسط محلول کار تایرود ×۱ به 5×10^{8} mL رساندیم. فرآورده‌ی PRP به دو قسمت مساوی تقسیم و تحت عنوان بخش ۱ و ۲ نام‌گذاری شد. بخش یک را با دور ۱۷۰۰g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ کرده و پلاسمای رویی فاقد پلاکت (PPP) را جدا نمودیم. پلاکت باقی‌مانده را با استفاده از محلول کار تایرود ×۱resuspend کرده و برای فلوسایتومتری به کانت 3×10^{7} mL رساندیم.[۱۱]

پلاکت‌ها با آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل (FITC Mouse IgG1 Isotype control (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA و یا آنتی‌بادی ضد GPIbα (e-) FITC Mouse Anti-human CD42b bioscience, America)، به‌مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه گردیده و در نهایت توسط Cyflow flow cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) و FlowJo software, version 7 (TreeStar, Ashland, OR, USA) مورد خوانش و آنالیز قرار گرفتند.

به بخش ۲ (فرآورده PRP) یونوفور کلسیم A23187 با غلظت نهایی ۵ µmol اضافه گردید که حدود دو ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ °C قرار داده شد (به‌عنوان نمونه کنترل مثبت ریزش) سپس با دور ۱۷۰۰ g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ و پلاسمای آن برای مطالعات ریزش جدا شد. سپس پلاسماهای جدا شده از پلاکت بخش ۱ (پلاسمای تیمار نشده با یونور کلسیم) و پلاسماهای جدا شده از پلاکت بخش ۲ (پلاسمای تیمار شده با یونوفور کلسیم) به‌ترتیب به مدت ۳۰ با دور ۲۰۰۰۰ g اولتراسانتریفوژ گردید.

در نهایت مایع رویی به‌عنوان نمونه فاقد میکروپارتیکل و حاوی رسپتورهای Shed شده از جمله GPIbα می‌باشد که در فریزر ۲۰- °C جهت بررسی توسط وسترن بلات ذخیره گردید. تمامی مراحل برای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

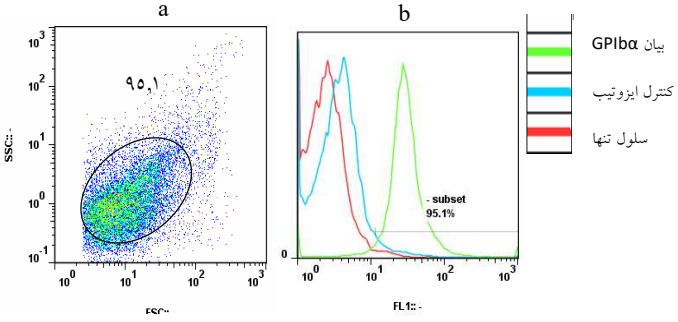
نمونه‌های روز اول، سوم و پنجم انجام شد و آنالیز داده‌های فلوسیتومتری از طریق Mean fluorescence intensity (MFI) جهت مطالعه GPIbα انجام پذیرفت.

آزمایش‌های وسترن بلات مطابق روشی که پیش‌تر توصیف گردیده است،[11] انجام پذیرفت که در نهایت با استفاده از ChemiDoc TM XRS system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفت.

برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism, version 6.07 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) استفاده گردید. برای مقادیر خام هر گروه میانگین و انحراف‌معیار محاسبه شد و برای مشخص کردن منشأ تفاوت احتمالی بین سه نمونه (روز یک، سه و پنج) از متد آماری Kruskal-Wallis test همراه با Dunn's multiple comparison test استفاده شد. در این مطالعه حصول مقادیر P<۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

به دنبال انکوباسیون پلاکت‌ها با آنتی‌بادی منوکلونال ضد رسپتور GPIbα (کونژوگه شده با FITC)، توسط تکنیک فلوسایتومتری تشخیص جمعیت پلاکتی (شکل ۱) انجام شد. در شکل ۱، نمودارهای Histogram (b) و Scatter gram (a) نشان داده شده است که میزان انحراف نمودار بیان GPIbα از نمودار ایزوتایپ کنترل نشانه



شکل ۱: بیان رسپتور GPIbα در سوسپانسیون پلاکتی جهت تشخیص جمعیت پلاکتی

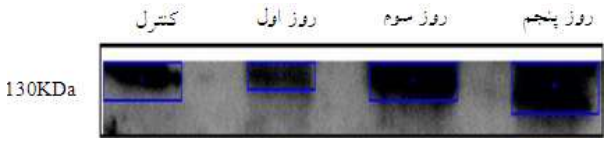
میزان بیان رسپتور در نمونه در حال استراحت می‌باشد. در نمودار هیستوگرام، محور افقی بیانگر FL1 (فلورسنت مربوط به FITC) و محور عمودی بیانگر تعداد پلاکت ها است.

در بررسی MFI بیان GPIbα در روز اول با بیان (۸۶±۵/۹)، به‌صورت (Mean±SD) نشان داده شد که در روز سوم به علت از دست دادن رسپتور GPIbα (ریزش و یا میکروپارتیکلیشن) کاهش پیدا کرد (۶۹±۶/۹). در روز پنجم نیز نسبت به روز سوم این کاهش ادامه یافت (۶۱±۷/۷) که البته این تفاوت‌ها معنادار نبودند، ولیکن به‌طور کلی از روز یک تا پنج با کاهش معناداری با (P=۰/۰۰۹۴) روبرو بودیم (نمودار ۱).

میانگین میزان بیان GPIbα در روز تهیه نمونه کنترل، بر حسب (Mean±SD)، ۹۱±۸/۳ بود. مطالعات آماری نشان داد که با استفاده از داده‌های MFI در روز اول تفاوت معناداری از نظر بیان GPIbα بین نمونه‌های پلاکت با انتخاب تصادفی با نمونه کنترل، وجود ندارد (نمودار ۲).

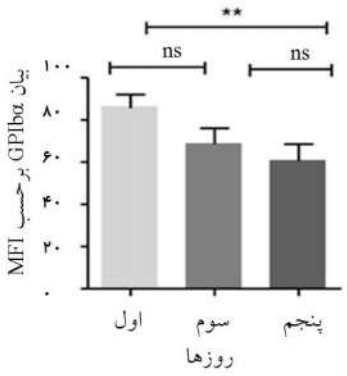
جهت بررسی میزان گلیکوکالیسین در فرآورده پلاکتی روز یک، سه و پنج با انجام تست وسترن بلات، نمونه‌ها از فریزر ۲۰- °C خارج گردیده، پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها با سمپل بافر (به نسبت یک دوم) در دمای ۹۰ °C حرارت داده شد. در شکل ٤، غشای PVDF حاوی باندهای گلیکوکالیسین (۱۳۰KDa) نمونه کنترل، روز اول، روز سوم و روز پنجم، به ترتیب از چپ به راست نشان داده شده است که روند افزایشی میزان گلیکوکالیسین در آن مشهود است.

جهت تعیین مقادیر عددی به منظورکشیدن نمودار، از نسبت Volume adjust intensity نمونه‌ها به Volume adjust intensity کنترل یونوفور استفاده گردید. مقادیر به‌دست آمده برای روز اول

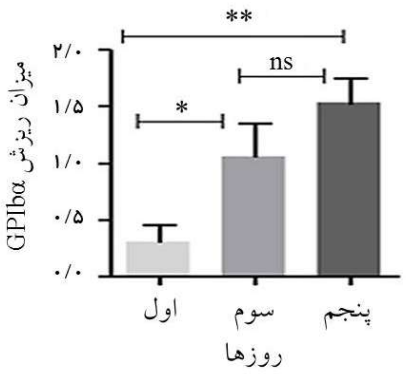


شکل ۲: تست وسترن بلات ملکول Shed شده GPIbα (گلیکوکالیسین) در روز یک، سه و ۵ و نمونه کنترل یونوفور

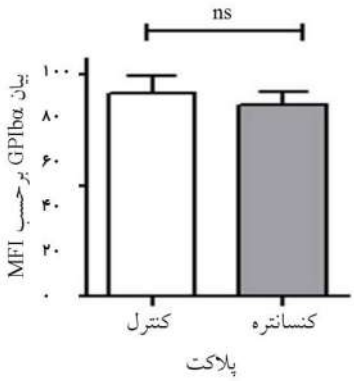
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]



نمودار ۱: نمودار تغییرات بیان GPIbα پلاکت‌ها طی روزهای نگهداری بر اساس MFI. ns: یعنی معنادار نمی‌باشد، ** یعنی اختلاف معنادار می‌باشد با (P<۰/۰۱).



نمودار ۳: نمودار مقایسه میزان گلیکوکالیسین در فرآورده‌های پلاکتی روز اول، سوم و پنجم



نمودار ۲: مقایسه میزان بیان GPIbα نمونه کنترل پلاکتی با فرآورده‌های پلاکتی کنسانتره روز اول. ns: یعنی معنادار نمی‌باشد.

بحث

تاکنون مطالعات مختلفی در فرآورده‌های متنوع پلاکتی صورت پذیرفته که همگی معطوف به بررسی روند فزاینده‌ی آسیب دوران نگهداری پلاکت‌ها در طول ذخیره‌سازی بوده‌اند. از جمله مطالعه Metcalfe و همکاران بر روی فرآورده‌های PRP، بافی کوت و آفرزیس طی هشت روز نگهداری فرآورده است که بیانگر کاهش میزان رسپتورسطحی GPIbα و افزایش چشمگیر میزان P-selectin می‌باشد.[۱۲] مطالعات Sandgren و Albanyan و Ostrowski نیز حاکی از کاهش میزان بیان GPIbα (MFI) همراه با افزایش بیان سایر مارکرهای فعالیتی پلاکتی همچون P-selectin، CD40L و PS در حین نگهداری پلاکت در انواع فرآورده‌های پلاکتی تولیدی بوده است.[۱۳و۱۴و۱۵]

مشابه این مطالعات، در مطالعه حاضر نیز ارزیابی‌های به‌عمل آمده حاکی از آن بود که در طی پنج روز نگهداری فرآورده‌های یاد شده، میزان بیان GPIbα متناسب با طول دوره نگهداری کاهش یافته است. ما همچنین نشان دادیم که میزان بیان رسپتور GPIbα (MFI) در روزهای اول با نمونه کنترل تولید شده تفاوتی نداشته است که این امر بیانگر کیفیت مطلوب فرآورده‌های پلاکتی روز اول می‌باشد.

در کنار بررسی بیان رسپتورهای پلاکتی، بسیاری از دانشمندان، مطالعه مقادیر محلول رسپتورهای مذکور را نیز به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم برررسی آسیب دوران نگهداری پلاکت‌ها مد نظر قرار داده‌اند.

(۰/۳۱+۰/۳)، سوم (۱/۰۶+۰/۶) و پنجم (۱/۵+۰/٤) به‌صورت (Mean±SD) می‌باشد. میزان مولکول گلیکوکالیسین در روز سوم نسبت به روز اول افزایش یافته که از نظر آماری معنادار بود.

در روز پنجم نیز نسبت به روز سوم افزایش مشاهده شد که البته از نظر آماری معنادار نبود. در نهایت این مطالعه نشان داد که در کل از روز اول تا روز پنجم نگهداری روند افزایشی در میزان گلیکوکالیسین پلاسما مشاهده می‌شود که از نظر آماری با (P=۰/۰۰۹۸) معنادار می‌باشد (نمودار۳).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

در مطالعه‌ای که توسط Kostelijk و همکاران بر روی نمونه‌های پلاکتی نگهداری شده در طی هشت روز انجام گرفت، با استفاده از تکنیک الایزا، میزان غلظت گلیکوکالیسین و P-selectin محلول بررسی گردید که نتایج گویای افزایش معنادار هر دوی مارکرهای مذکور در حین نگهداری پلاکت بوده است.[۱۶] در ادامه Seghatchian و همکارانش در مطالعه‌ای که بر روی انواع فرآورده‌های پلاکتی انجام دادند نیز افزایش مداوم گلیکوکالیسین را در روزهای یک، پنج و هفت پس از نگهداری نشان دادند.[۱۷] این مطالعه تکمیل کننده مطالعه پیشین Kunishima و همکاران می‌باشد که افزایش میزان GC (گلیکوکالیسین) را نشان داده بودند.[۱۸]

مطالعه حاضر نیز تاییدکننده‌ی بررسی‌های انجام شده که حاکی از افزایش میزان GC متناسب با طول زمان نگهداری است. تفاوت تکنیکی این مطالعه در مقایسه با مطالعات پیشین استفاده از روش مرجع وسترن بلات به جای آزمایش‌های الایزا در تخمین میزان GC می‌باشد. در این راستا مطالعه ما نشان داد که میزان GC در روز سوم نگهداری افزایش معناداری نسبت به روز اول داشته است که این افزایش تا روز پنجم نیز ادامه یافته به قسمی که مقایسه افزایش روز پنجم نسبت به روز اول نشان از تفاوت چشمگیرتر میزان این ماده محلول می‌باشد. کاهش چشمگیر میزان بیان رسپتور چسبندگی GPIbα همراه با افزایش فزاینده مقادیر GC در روز پنج نگهداری در فرآورده‌ها، ممکن است اثرات نامطلوبی را بر فرایندهای چسبندگی پلاکتی در Sheer بالا و یا واکنش‌های متقابل پلاکت- لکوسیت بر جای بگذارد که این امر به‌خصوص در برخی از بیمارانی که مصرف‌کننده واحدهای متعدد پلاکتی می‌باشند، حائز اهمیت است. این احتمال البته علاوه بر نقشی است که ریزش رسپتور GPIbα در کاهش ریکاوری پلاکت‌ها به واسطه کلیرانس زود هنگام آنها توسط گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتیینی ماکروفاژهای سیستم اندوتلیال دارند.

مطالعه حاضر حاکی از کاهش معنادار سطوح بیان رسپتور عملکردی GPIbα پلاکت‌ها در طول نگهداری به‌خصوص در فرآوردهای پلاکتی روز پنجم بوده است. با توجه به اینکه این مشاهدات همراه با افزایش ریزش خارج غشایی (Shedding) این رسپتور در طول نگهداری فراورده بوده است به‌نظر می‌رسد مکانیسم مذکور به‌عنوان دلیل اصلی کاهش رسپتور GPIbα در شرایط نگهداری فرآورده محسوب گردد.

سپاسگزاری: این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۳۹۰-۰۱-۳۳-۱۴۹۶ دکتر مهران قاسم‌زاده می‌باشد که قسمتی از آن بخشی از پایان‌نامه خانم زینب پیرمحمدجماعت دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون را تشکیل می‌دهد. مولفین از حمایت سازمان انتقال خون قدردانی می‌نمایند.

References

1. Holme S, Moroff G, Murphy S. A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion* 1998;38(1):31-40.
2. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010;116(12):2011-8.
3. Curvers J, Van Pampus E, Feijge MA, Rombout-Sestrienkova E, Giesen PL, Heemskerk JW. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion* 2004;44(1):49-58.
4. Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009;41(2):105-13.
5. Quinn M, Fitzgerald D, eds. Platelet Function Assessment, Diagnosis, and Treatment. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 4, 44-9, 115-26, 35-36.
6. 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.
7. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost* 2015;113(6):1224-35.
8. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* 2013;131(3):191-7.
9. Azorsa DO, Moog S, Ravanat C, Schuhler S, Folléa G, Cazenave JP, et al. Measurement of GPV released by activated platelets using a sensitive immunocapture ELISA--its use to follow platelet storage in transfusion. *Thromb Haemost* 1999;81(1):131-8.
10. Bergmeier W, Piffath CL, Cheng G, Dole VS, Zhang Y, von Andrian UH, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIbalpha shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res* 2004;95(7):677-83.
11. 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.
12. Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, Swann I, Ouwehand WH, Goodall AH. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol* 1997;98(1):86-95.
13. 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 Atreus 2C+ system: in vitro study. *Transfusion* 2008;48(4):688-96.
14. 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.
15. Ostrowski SR, Bochsen 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.
16. Kostelijk E, Folman C, Gouwerok C, Kramer C, Verhoeven A, De Korte D. Increase in glycocalicin levels in platelet concentrates stored in plasma or synthetic medium for 8 days: comparison with other platelet activation markers. *Vox Sang* 2000;79(1):21-6.
17. Seghatchian J. Elevated FXIIIA and serine proteases upon filtration of platelet concentrate on negatively charged filters: comparison with other established haemostatic markers of platelet activation and storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2003;29(2):123-5.
18. Kunishima S, Shimizu T, Kora S, Kamiya T, Ozawa K. Determination of glycocalicin in platelet concentrate supernatants stored in a synthetic medium (Seto solution). *Vox Sang* 1998;75(1):74-5.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

TUMJ Tehran University Medical Journal, May 2016; Vol. 74, No. 2: 92-98 Original Article

The expression loss of GPIbα due to ectodomain shedding in PRP derived platelet concentrates during storage

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

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

Abstract

Received: 10 Nov. 2015 Revised: 09 Jun. 2016 Accepted: 24 Jun. 2016 Available online: 25 Jun. 2016

***Background*:** Platelet adhesion typically occurs by the critical role of GPIb-V-IX in capturing free-flowing platelets to the injured vessel wall where its rapid binding kinetics enables platelet tethering even under conditions of high shear through the interaction of the major ligand-binding subunit of GPIb-V-IX, GPIbα with subendothelial-bound vWF. During storage, platelet undesired activation may lead to platelet storage lesion (PSL) which changes the expression levels of platelet functional receptors including GPIbα. This study investigates the levels of expression and ectodomain shedding of platelet adhesive receptor GPIbα during the storage of platelet rich plasma (PRP) concentrates (PRP- PCs).

***Methods*:** Five PRP-platelet concentrates were obtained from Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO). The GPIbα expressions of platelets were analyzed on day 1, 3 and 5 after storage using flowcytometry. To examine the ectodomain shedding of this receptor the microparticle free supernatants obtained from stored platelets were subjected to western blot analysis. For control study, blood specimens was drawn from healthy consenting individuals and resting platelets were isolated while resuspended in Tyrode buffer.

***Results*:** Our results indicated a continuous decrease of GPIbα expression during storage where the expression from fist day (Mean fluorescence intensity=86±5.9) was significantly reduced compared to that of fifth day (mean fluorescence intensity=61±7.7) after storage (P=0.0094). Conversely, shed GPIbα (Glycocalicin) demonstrated continuous elevation during five-day storage (P=0.0098). According to the results the shedding levels for the first day were increased from 0.31±0.3 to 1.5±0.4 by the day 5 after storage.

Conclusion: Our study has demonstrated significant loss of platelet GPIbα during storage mostly due to receptor ectodomain shedding that leads to significant increase of soluble GPIbα in stored platelets. Considering the high levels of shed GPIbα in long stored platelets whether the transfusion of such products might be associated with defective adhesive function of platelets or possible proinflammatory effects could be of interests for future investigation.

Keywords: glycocalicin, GPIbα, platelet activation, platelet-rich plasma, thrombosis.

* 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: mehran1476@yahoo.com

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]