

اثر فرایند کاهش لکوسیتی پیش از ذخیره بر سطوح بیان مولکول پیش التهابی CD40L در فرآورده‌های پلاکت رندوم حاصله از PRP

مریم شریف رازی: کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.
 مهرا ن قاسم زاده: دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، فلوشیپ پلاکت و هموستاز، استادیار موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.
 احسان صراف کاررونی: کارشناسی ارشد هماتولوژی، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.
 * احترام السادات حسینی: دکتری تخصصی هماتولوژی، استادیار موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران (*نویسنده مسئول).
 e.hosseini10@yahoo.com.au

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: برخی از مطالعات علوم پایه حاکی از تأثیر لکوسیت‌ها در فعال‌سازی پلاکت‌ها می‌باشند. از آنجایی که CD40L از مولکول‌های پیش التهابی مهم پلاکتی بوده و همچنین میزان آن در فرآورده‌های پلاکتی می‌تواند به‌عنوان یک مارکر تشخیصی در فرایند PSL (Platelet Storage Lesion) محسوب گردد، در مطالعه حاضر به بررسی اثر فرایند کاهش لکوسیتی بر میزان بیان CD40L در پلاکت‌های کنسانتره پرداخته شد. **روش کار:** کنسانتره‌های پلاکتی حاصل از PRP (Platelet Rich Plasma) بعد از تهیه به دو گروه پلاکت‌های کنسانتره (غیر فیلتره) و فیلتره شده پیش از ذخیره تقسیم گردیدند. با استفاده از روش فلوسایتومتری، سطوح بیان CD40L در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از ذخیره در هر دو فرآورده مذکور سنجیده و مقایسه شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Graphpad استفاده گردید. برای مشخص کردن منشأ تفاوت احتمالی بین سه روز نگهداری از آزمایش Kruskal Wallis استفاده شد. برای مقایسه تفاوت‌های بین دو گروه از Mann-Whitney U test استفاده گردید. **یافته‌ها:** بیان CD40L در روزهای ۱، ۳ و ۵ در فرآورده‌های غیر فیلتره به ترتیب $35 \pm 5 / 06$ ، $62 \pm 5 / 84$ و $82 \pm 6 / 19$ درصد بود که بیان این مولکول در روزهای سوم و پنجم نگهداری افزایش معناداری را نسبت به روز اول نشان داد ($p > 0.05$). بیان CD40L در روزهای ۱، ۳ و ۵ در فرآورده‌های فیلتره نیز به ترتیب 41 ± 4 ، 24 ± 4 و 51 ± 6 بود درحالی که الگوی افزایشی مشابهی از بیان CD40L در اینجا نیز مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که در فرآورده‌های فیلتره کاهش لکوسیتی، میزان بیان CD40L در روزهای ۳ و ۵ نگهداری کاهش معناداری نسبت به پلاکت‌های غیر فیلتره داشت. **نتیجه‌گیری:** نتایج حاکی از تأثیر لکوسیت‌ها در القای فرایند PSL بود. همچنین با توجه به اهمیت مولکول CD40L در فرایندهای التهابی، به نظر می‌رسد که کاهش بیان این مولکول متعاقب فیلتراسیون بتواند در کاستن عوارض نامناسب انتقال فرآورده‌های پلاکتی مؤثر باشد.

کلیدواژه‌ها: بیان CD40L، پلاکت کنسانتره، فیلتراسیون کاهش لکوسیتی

مقدمه

پلاکت، اگریگاسیون، آزادسازی، بازآرایی سایتواسکتون پلاکتی و تغییرات تقارن لیپیدی غشا و همین‌طور ماکرو پارتیکلشن در پلاکت‌ها می‌گردد (۲) که در ارتباط با بازیابی فعالیت (Recovery)، بقای کاهش یافته و کاهش ظرفیت هموستاتیک پلاکت در سیستم *in vivo* می‌باشد. این عارضه به‌طور کلی با یکسری شواهد مرفولوژیک و مولکولی شناخته می‌شود که حاکی از فعال شدن پلاکت و تغییرات در متابولیسم آن است (۳).

به‌طور کلی فعالیت پلاکتی در پلاکت‌های ذخیره شده به‌صورت اولیه با اندازه‌گیری ترشح بتا ترومبوگلوبین و یا P-sel سطح سلول مورد بررسی

جداسازی و نگهداری پلاکت‌ها می‌تواند همراه با افزایش برگشت‌پذیر و یا برگشت‌ناپذیر در سطوح پایه‌ای فعالیت پلاکتی باشد (۱). بدیهی است میزان و ماهیت این افزایش فعالیت، خود تابعی از عوامل محیطی و میزان استرس‌های فیزیکی و احیاناً شیمیایی است که حین تولید و نگهداری پلاکت ایجاد می‌شود.

کلیه عواملی که منجر به فعالیت ناخواسته و افزایش‌یابنده پلاکتی در حین نگهداری می‌شوند، موجب فرایندی تخریبی می‌گردند که از آن تحت عنوان PSL (Platelet Storage Lesion) یاد می‌شود. PSL منجر به تغییراتی در عملکرد

صورت پذیرد.

البته قابل ذکر است که برخلاف سایتوکاین‌های محلول آزاد شونده از گرانول‌های آلفا، CD40L نیز همانند P-sel ابتدا در غشای پلاکت بیان می‌گردد که متعاقباً با پیشرفت پروسه فعال شدن پلاکتی که توأم با افزایش کلسیم داخل سلولی و القای فعالیت متالوپروتئینازهای غشایی است طی فرایند Ectodomain Shedding که پروسه‌ای وابسته به زمان می‌باشد از حالت اتصال غشایی رها شده و در محیط آزاد می‌شود (۱۰). با توجه به مطالعات یاد شده به نظر می‌رسد بیان رسپتورهای غشایی و محلول P-sel و یا فرم‌های غشایی و محلول CD40L در فرآورده‌های پلاکتی نگهداری شده امری قطعی باشد که از تبعات PSL محسوب می‌گردد. باین‌وجود قطع نظر از عوامل تأثیرگذار در کنترل و بهبود این پروسه و یا عوارض ایجابی بعد از تزریق، آنچه اهمیت بیان این مولکول‌ها را مضاعف می‌نماید حضور مقادیر متنابهی از انواع لکوسیت‌ها در فرآورده‌های پلاکتی است که می‌توانند تحت تأثیر این عوامل پیش التهابی در شرایطی از تحریک‌شدگی و فعالیت قرار بگیرند (۱۱-۱۴) شرایطی که منتهی به تحریک و آزاد شدن منابعی از سایتوکاین‌ها و یا پروتئازهای لکوسیتی می‌شود که می‌توانند منجر به فیدبک تحریکی لکوسیت‌ها در القای ایجاد فرآیندهای انعقادی (۱۵) و یا احیاناً فعال شدن بیشتر پلاکت‌ها و توسعه فرایند PSL شوند (مطالعات منتشر نشده قاسم زاده و همکاران در مرکز بیماری‌های خون استرالیا). اینکه آیا فرایند کاهش پیش از ذخیره لکوسیت‌ها از فرآورده‌های پلاکتی بتواند همانند P-sel موجبات کاهش بیان CD40L را نیز فراهم نماید موضوعی شایان توجه است که می‌تواند حاکی از نقش لکوسیت‌ها در القای مضاعف فرایند PSL در فرآورده‌های پلاکتی باشد.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده و جامعه مورد مطالعه متشکل از پلاکت‌های متراکم و خون کامل بوده است. نمونه‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. جمعاً ۵ کیسه از پلاکت‌های متراکم برای

قرار می‌گیرد (۴). با این‌وجود علاوه بر P-sel و کموکاین‌های پلاکتی، مطالعات انجام شده بر روی فرآورده‌های پلاکتی نگهداری شده، همچنین حاکی از سطوح افزایش یافته بیان CD40L و فرم محلول آن در حین نگهداری پلاکت است (۵). CD40L و رسپتور آن نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی ایفا می‌نمایند (۴، ۶). این مولکول به‌صورت اولیه بر روی سلول‌های سیستم ایمنی همانند لنفوسیت‌های CD4⁺، ماست سل، بازوفیل، ائوزینوفیل و سلول‌های کشنده طبیعی بیان می‌شود. بعلاوه نشان داده شده است که CD40L و CD40 همچنین در سلول‌های دیگری از جمله سلول‌های اندوتلیال، عضلات صاف، منوسیت‌ها و ماکروفاژها نیز بیان می‌گردد (۷). علاوه بر سلول‌های ایمنی، اولین بار هن (Henn) و همکاران، بیان CD40L و CD40 را همچنین بر روی پلاکت‌ها نیز نشان دادند (۸، ۹). متعاقباً مطالعات بعدی نشان داد که مولکول CD40L به‌صورت cryptic (خفته) در پلاکت‌های تحریک نشده موجود است که بلافاصله متعاقب تحریک بر سطح پلاکت بیان می‌شود که متعاقباً ظرف چند دقیقه یا چند ساعت از روی سطح غشای سلولی بریده شده و به‌صورت soluble CD40L (sCD40L) در محیط آزاد می‌گردد. مطالعه‌ی توزیع سلولی CD40L نشان داده است که ۹۵٪ شکل محلول این مولکول در گردش خون حاصل از پلاکت‌هاست؛ بنابراین به نظر می‌رسد واکنش‌های تحریکی پلاکت باید به‌عنوان یکی از منابع ایجادکننده‌ی نقش‌های بیولوژیک و پاتولوژیک این مولکول در نظر گرفته شود (۱۰).

مطالعات *in vitro* نشان داده است که در پلاکت‌های تحریک نشده‌ی در حال استراحت، CD40L در سطح سلول بیان قابل توجهی ندارد در حالی که متعاقب فعال شدن پلاکت به‌وسیله آگونیست‌هایی مانند ADP، ترومبین و یا کلاژن در سطح پلاکت به‌صورت مشخصی بروز می‌یابد. به نظر می‌رسد این جابجایی CD40L پس از آزادسازی گرانول‌های آلفای پلاکتی و همراه با آزاد شدن سایر مولکول‌های گرانولی همچون P-sel، PDGF، TGFβ و یا فاکتور ۴ پلاکتی و

بررسی نمونه‌های پلاکتی متراکم غیر فیلتره و ۵ کیسه از پلاکت‌های متراکم برای بررسی نمونه‌های فیلتره مورد استفاده قرار گرفت. بعلاوه از ۵ کیسه خون کامل نیز پلاکت جدا شد و به‌عنوان کنترل مورد استفاده و مطالعه قرار گرفت.

فیلتراسیون کاهش لکوسیتی فرآورده‌های پلاکتی به‌وسیله فیلترهای in line محصول شرکت PALL (RF#: PL1 BE) انجام شد سپس نمونه‌های پلاکتی فیلتره و غیر فیلتره مطابق شرایط استریل آزمایشگاهی با استفاده از دستگاه متصل کننده کیسه‌های خون (TERUMO) (STERILE TUBING WELDER TSCDII)، به سه قسمت تقریباً مساوی تقسیم و به سه کیسه‌ی اقماری منتقل شده در انتهای کار کورد هر کیسه توسط سیلر برقی ACS-152 Tube sealer مسدود گردید و تا زمان آزمایش در آژیتاتور پلاکتی انکوباتوردار و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیده و برای مطالعات روزهای اول، سوم و پنجم مورد استفاده واقع شد.

بعد از فیلتراسیون، گلبول‌های سفید با استفاده از چمبر نجت (Nageotte Chamber) شمارش شدند تا از کاهش استاندارد شمارش لکوسیتی اطمینان حاصل گردد. سپس فرآورده‌ی پلاکتی با دور ۱۷۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده و تکمه پلاکتی در محلول تاپرود حاوی Apyrase (0.02 U/ml) و کلرید کلسیم 100Mm سوسپانسیون گردیدند. متعاقباً این پلاکت‌ها با FITC Mouse anti-human CD40L و FITC

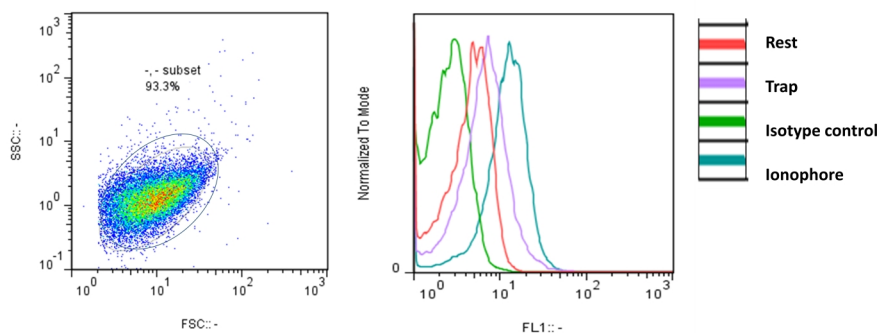
بررسی نمونه‌های پلاکتی متراکم غیر فیلتره و ۵ کیسه از پلاکت‌های متراکم برای بررسی نمونه‌های فیلتره مورد استفاده قرار گرفت. بعلاوه از ۵ کیسه خون کامل نیز پلاکت جدا شد و به‌عنوان کنترل مورد استفاده و مطالعه قرار گرفت.

فیلتراسیون کاهش لکوسیتی فرآورده‌های پلاکتی به‌وسیله فیلترهای in line محصول شرکت PALL (RF#: PL1 BE) انجام شد سپس نمونه‌های پلاکتی فیلتره و غیر فیلتره مطابق شرایط استریل آزمایشگاهی با استفاده از دستگاه متصل کننده کیسه‌های خون (TERUMO) (STERILE TUBING WELDER TSCDII)، به سه قسمت تقریباً مساوی تقسیم و به سه کیسه‌ی اقماری منتقل شده در انتهای کار کورد هر کیسه توسط سیلر برقی ACS-152 Tube sealer مسدود گردید و تا زمان آزمایش در آژیتاتور پلاکتی انکوباتوردار و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیده و برای مطالعات روزهای اول، سوم و پنجم مورد استفاده واقع شد.

بعد از فیلتراسیون، گلبول‌های سفید با استفاده از چمبر نجت (Nageotte Chamber) شمارش شدند تا از کاهش استاندارد شمارش لکوسیتی اطمینان حاصل گردد. سپس فرآورده‌ی پلاکتی با دور ۱۷۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده و تکمه پلاکتی در محلول تاپرود حاوی Apyrase (0.02 U/ml) و کلرید کلسیم 100Mm سوسپانسیون گردیدند. متعاقباً این پلاکت‌ها با FITC Mouse anti-human CD40L و FITC

یافته‌ها

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در آزمایش فلوسیتومتری با پلاکت‌های کنترل تولیدی ابتدا گیت پلاکتی در آنالیز اسکترگرام (a) مشخص شد و بیان CD40L پایه و همچنین بیان متعاقب تیمار با آگونیست‌های TRAP و یونوفور کلسیم در هیستوگرام (b) ارزیابی گردید.



نمودار ۱- بیان CD40L در فرآورده‌های پلاکتی کنترل

جدول ۱- میانگین درصد بیان CD40L در پلاکتهای کنسانتره (بدون فیلتراسیون) طی روزهای نگهداری

روزهای نگهداری	۱	۳	۵
درصد بیان CD40L (Mean ±SD)	۳۵±۱۰/۱	۶۲±۱۱/۶	۸۲±۱۲/۳
درصد بیان CD40L (Mean ±SE)	۳۵±۵/۰۶	۶۲±۵/۸۴	۸۲±۶/۱۹

جدول ۲- میانگین درصد بیان CD40L در پلاکتهای فیلتر شده طی روزهای نگهداری

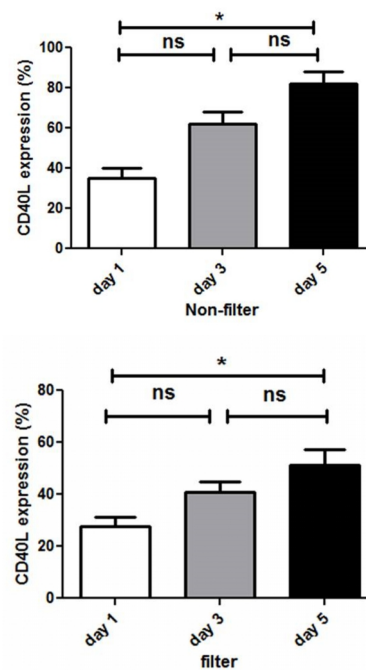
روزهای نگهداری	۱	۳	۵
CD40L (Mean±SD)	۲۴±۷/۵	۴۱±۸/۳	۵۱±۱۲/۳
CD40L (Mean±SE)	۲۴±۴	۴۱±۴	۵۱±۶

میزان بیان مولکول CD40L در نمونه‌های پلاکتی کنسانتره و فیلتره روزهای اول تفاوت معناداری با نمونه کنترل تهیه شده در آزمایشگاه نداشته است ($p > 0.05$) (نمودار ۲). هر سه نمونه کنترل، فیلتره و غیر فیلتره در روزهای اول از نظر تحریکات آگونیستی مورد مطالعه قرار گرفتند که پاسخ‌های مشابهی را نشان دادند.

همان‌طور که در نمودار ۳ نشان داده شده است در فرآورده‌های پلاکتی کنسانتره غیر فیلتره، سطوح بیان CD40L در روزهای ۱، ۳ و ۵ به ترتیب $۳۵ \pm ۵/۰۶$ ، $۶۲ \pm ۵/۸۴$ و $۸۲ \pm ۶/۱۹$ درصد برحسب $Mean \pm SE$ بود. همان‌طور که اعداد نشان می‌دهد سطوح بیان CD40L در روز سوم نگهداری نسبت به روز اول افزایش داشت که معنا دار نبود ($p > 0.05$). سطوح بیان CD40L در روز پنجم نسبت به روز سوم افزایش نشان داد ولی این افزایش نیز از نظر آماری معنادار نبود ($p > 0.05$). بیان CD40L در روز پنجم نسبت به روز اول افزایش نشان داد که از نظر آماری معنادار بود ($p > 0.05$). در فرآورده‌های فیلتر شده، سطوح بیان CD40L در روزهای ۱، ۳ و ۵ به ترتیب ۲۴ ± ۴ ، ۴۱ ± ۴ و ۵۱ ± ۶ درصد بود. سطوح بیان CD40L در روز سوم نگهداری نسبت به روز اول افزایش نشان داد که البته از نظر آماری معنادار نبود ($p > 0.05$). بیان CD40L در روز پنجم نسبت به روز اول افزایش نشان داد که از نظر آماری معنادار بود ($p > 0.05$).

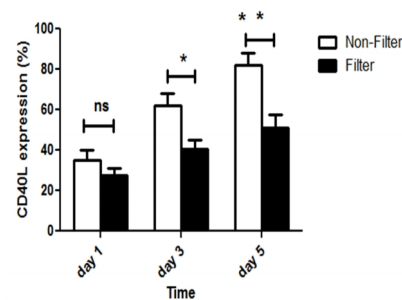
مقایسه کلی بیان CD40L در فرآورده‌های پلاکتی فیلتره و غیر فیلتره در طی نگهداری: همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود بیان CD40L هم در فرآورده‌های پلاکتی غیر فیلتره و

میانگین میزان بیان CD40L در روز تهیه نمونه کنترل $۲۷/۵۰ \pm ۵/۵۰$ برحسب $Mean \pm SE$ بوده و



نمودار ۳- نمودار تغییرات بیان CD40L پلاکتهای فیلتر شده و غیر فیلتره در طی نگهداری

ns (not significant; $p > 0.05$), * (significant; $p < 0.05$)
Data are mean ± SE (standard error)



نمودار ۴- تغییرات بیان CD40L فرآورده‌های فیلتره و غیر فیلتره در طی نگهداری

ns (not significant; $p > 0.05$), * (significant; $p < 0.05$)
* (significant; $p < 0.01$)

آزمایشگاه و هم در نمونه‌های مورد مطالعه فرآورده‌های پلاکتی روز اول مشاهده نمودیم که همراه با سطوح افزایش یافته‌ی بیان این مولکول متعاقب تحریکات آگونیستی در این نمونه‌ها بوده است. افزایش CD40L متعاقب تحریکات آگونیستی مشابه یافته‌های قبلی ما در خصوص افزایش Psel در پاسخ به آگونیست‌هاست که حاکی از ارزش مشابه این دو مارکر پلاکتی در تعیین سطح فعالیت پلاکتی می‌باشد (۱۰).

گزارشات موجود همچنین نشان داده‌اند که بیان و شکل محلول CD40L در طول نگهداری فرآورده پلاکتی افزایش می‌یابد که این افزایش فارغ از اینکه می‌تواند بر اهمیت مولکول CD40L بعنوان یکی از مارک‌های تشخیصی PSL صحنه بگذارد از طرفی با توجه به اهمیت بالای این مولکول بعنوان یک شاخص التهابی قوی می‌تواند بعنوان عامل بالقوه القای واکنش‌های خطرناک انتقال خون همچون واکنش‌های تب‌زا و یا آسیب حاد ریه مرتبط با انتقال خون (Transfusion Related Acute Lung Injury) در نظر گرفته شود (۹). در بررسی انجام شده توسط اسکالر و همکارانش بر روی محصولات پلاکتی تهیه شده به روش بافی کوت، مشخص گردید که CD40L نیز مانند سایر مارک‌های فعالیت پلاکتی همچون P-Selectin روند افزایش بیان را در خلال ۹ روز نگهداری نشان می‌دهد، به قسمی که بیان P-Selectin در طول زمان نگهداری ارتباط مستقیمی با بیان CD40L داشته است (۲۰).

متعاقباً در مطالعات بعدی کافمن و همکارانش پلاکت‌های کنسانتره‌ی حاصل از دو روش PRP و آفرزیس را مورد مطالعه قرار دادند که نتایج این گروه نیز حاکی از افزایش بیان CD40L متناسب با طول زمان نگهداری است. مطالعات این محققان نشان داد که پلاکت‌های آفرزیس، سطوح بالای بیان CD40L را از روز سوم پس از نگهداری نشان می‌دهند ضمن اینکه بررسی CD40L در روش PRP توسط نیز حاکی از افزایش بیان ۲۷ درصدی این مولکول در روز اول و افزایش ۶۰ درصدی آن تا روز پنجم بوده است (۵). همچنین در تحقیقات انجام شده توسط اسکریپ

هم در فرآورده‌های پلاکتی فیلتره کاهش لکوسیتی در طی دوران نگهداری به صورت صعودی افزایش نشان داده است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، در روز اول نگهداری در فرآورده پلاکتی کنسانتره غیر فیلتره و فیلتره تفاوت معناداری در بیان CD40L وجود نداشت؛ در حالی که در روز سوم و پنجم این تفاوت از نظر آماری معنادار بود.

بحث و نتیجه‌گیری

فرآیند PSL همراه با افزایش شاخص‌های فعالیت پلاکت‌ها می‌باشد که در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. از جمله شاخص‌های فعالیت مهم پلاکت‌ها، میزان بیان و ریزش مولکول P-Sel می‌باشد (۱۶). البته P-sel تنها مارکر تشخیصی فعالیت پلاکتی نیست و مطالعات فنوتیپیک مختلف انجام شده حاکی از بروز تغییرات در سطوح بیان سایر رسپتورهای پلاکتی می‌باشند (۱۷). از آن جمله هن و همکارانش نشان دادند که مولکول CD40L نیز در سطح قابل توجهی بر روی پلاکت‌های فعال بیان می‌شود (۹). مطالعات دیگری هم وجود دارد که حاکی از ارتباط مستقیم بین اگریگاسیون پلاکتی و بیان CD40L سطحی پلاکت‌هاست. در این راستا مطالعات بالینی نیز ارتباط مستقیمی را بین افزایش بیان دو مارکر CD40L و P-Selectin در بیماریه‌های قلبی عروقی نشان داده‌اند (۱۸) که همگی تایید کننده ارزش مطالعه میزان CD40L بعنوان یک شاخص ارزیابی مطمئن برای فعالیت پلاکتی است (۱۰).

مطالعه میزان بیان CD40L پلاکتی در پاسخ به آگونیست‌های تحریکی نیز می‌تواند بعنوان ملاک ارزیابی معتبری جهت تایید این مولکول بعنوان شاخص فعالیت پلاکت‌ها در نظر گرفته شود. در مطالعه فورمن و همکارانش، پلاکت‌های حاصل از PRP توسط آگونیست‌های مختلف تحریک شدند و متعاقباً میزان بیان CD40L هم در پلاکت‌های تحریک شده با آگونیست و هم در پلاکت‌های تحریک نشده سنجیده شد که حاکی از افزایش بیان CD40L در حضور آگونیست‌ها بود (۱۹). ما نیز در مطالعه‌ی خود سطوح نسبتاً پایینی از CD40L را هم در نمونه کنترلی پلاکت تولیدی

این مطالعات می‌توان به کاهش بیان وشکل محلول P-sel در فرآورده های فیلتره (۲۳-۲۵) اشاره نمود.

بعلاوه از آنجایی که مطالعات قبلی همچنین حاکی از ارتباط مستقیم واکنش های نامطلوب با افزایش بیان مولکول CD40L می‌باشد (۴)، به نظر می‌رسد در خصوص این مولکول نیز کاهش لکوسیتی تأثیرات مثبتی در کاهش بیان آن ایفا نماید. لذا ما در مطالعه خود همچنین به مقایسه میزان بیان مولکول یاد شده در فرآورده های پلاکتی کاهش لکوسیت یافته (فیلتره) نسبت به فرآورده های کنسانتره (غیر فیلتره) پلاکتی نیز پرداخته ایم. نتایج حاصله از این مقایسه حاکی از آن بوده است که فرآیند کاهش لکوسیتی می‌تواند همانند رسپتور P-sel باعث کاهش آزادسازی CD40L از منابع داخلی پلاکتی و بیان پایین تر آن در فرآورده های کم لکوسیت گردد.

در خاتمه شایان ذکر است که ضمن آنکه مشاهده می‌تواند پیشنهاد دهنده می‌تواند کاهش فرآیند PSL متعاقب فیلتراسیون کاهش لکوسیتی باشد، با توجه به نقش مهمی که مولکول CD40L در القای فرایندهای التهابی لکوسیت ها ایفا می‌نماید، همچنین شاید بتواند بعنوان یکی از دلایل عوارض التهابی کمتر تزریق این فرآورده ها در فرد گیرنده محسوب گردد (۱۴، ۲۶).

تقدیر و تشکر

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۴۹۶-۳۳-۰۱-۱۳۹۰ دکتر مهران قاسم‌زاده می‌باشد که قسمتی از آن بخشی از پایانامه خانم مریم شریف رازی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون را تشکیل میدهد. نویسندگان از حمایت‌های مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون و همچنین معاونت محترم کنترل کیفی سازمان انتقال خون سرکار خانم دکتر امینی تشکر می‌نمایند، هم چنین همکاری مجدانه پایگاه انتقال خون استان تهران به خصوص خانم فاطمه عباسی نیز شایان تقدیر است. نویسندگان همچنین از زحمات خانم مهندس مریم السادات طاهری تشکر می‌نمایند.

چنکو و همکارانش، بیان CD40L با ۳ روش بافی کوت، PRP و آفرزیس سنجدیده شد که نتایج بدست آمده حاکی از افزایش بیان CD40L در طی ۷ روز نگهداری در هر ۳ روش بود. با این وجود از نظر میزان بیان مولکول یاد شده، تفاوت معناداری بین این روش‌ها مشاهده نشد (۴).

مطالعه‌ی حاضر همراستا با مطالعات یاد شده نیز نتایج مشابهی نشان داده است به قسمی که درصد بیان CD40L چه در فرآورده های پلاکتی کنسانتره (غیر فیلتره) و چه در فرآورده های کاهش لکوسیت یافته (فیلتره)، روند افزایشی را در روزهای اول، سوم و پنجم نگهداری نشان داده است. لذا با توجه به مطالعات صورت گرفته به نظر می‌رسد که بیان مولکول های غشایی CD40L در فرآورده های پلاکتی ذخیره شده امری قطعی باشد که در نتیجه‌ی توسعه فرآیند PSL ایجاد می‌شود. با این حال صرف نظر از این نتایج، پیش بینی دیگری که در مطالعه ما جلب نظر می‌نمود احتمال تفاوت مقادیر این افزایش بیان در شرایط کاهش لکوسیتی (فیلتره) نسبت به پلاکت های کنسانتره (غیر فیلتره) می‌بوده است. مطالعات علوم پایه متعددی وجود دارد که حاکی از نقش واکنشهای متقابل پلاکت ها و لکوسیت ها در افزایش فعالیت همدیگر چه در شرایط *in vitro* و چه در شرایط *in vivo* می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد لکوسیت های موجود در فرآورده های پلاکتی که متعاقب تحریک توسط پلاکت ها و یا در حین نگهداری به صورت فعال در آمده‌اند بتوانند متعاقب آزاد نمودن مدیاتورهای التهابی، انواع پروتئازها همچون کاتپسین G، رادیکالهای آزاد اکسیژن و یا طی فرایندهای چسبندگی (Adhesive) خود منجر به فعال گردیدن مضاعف پلاکت های موجود (۱۵، ۲۱) و همچنین توسعه فرآیند PSL گردند؛ بنابراین به نظر می‌رسد فرآیند کاهش لکوسیتی در حین ذخیره، اثر مثبتی در کاهش PSL در فرآورده های پلاکتی در طول نگهداری داشته باشد. جالب توجه اینکه معدود مطالعات انجام شده نیز حاکی از آن است که این فرآیند کاهش لکوسیتی می‌تواند از افزایش فعالیت پلاکت ها و فرآیند PSL تا حد مطلوبی جلوگیری نماید (۲۲) که از جمله

accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*. 2006;108(7):2455-62.

15. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thrombosis research*. 2013;131(3):191-7.

16. Plaza E, Céspedes P, Fernandez H, Sánchez-Guiu M, Egea J, Vicente V, et al. Quality assessment of buffy-coat-derived leucodepleted platelet concentrates in PAS-plasma, prepared by the OrbiSac or TACSI automated system. *Vox sanguinis*. 2014;106(1):38-44.

17. 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.

18. Riondino S, Martini F, La Farina F, Spila A, Guadagni F, Ferroni P. Increased plasma levels of soluble CD40 ligand correlate with platelet activation markers and underline the need for standardized pre-analytical conditions. *Clinical biochemistry*. 2010;43(7):666-70.

19. Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12):2319-25.

20. Schaller M, Hofmann A, Connor J, Nydegger U. Filtered platelet concentrates from pooled buffy coats show comparable storage lesions when stored for 9 d at 20–24° C or when supplemented with ThromboSol™ at 2–6° C. *European journal of haematology*. 2000;64(6):401-10.

21. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost*. 2015;113(6):1224-35.

22. Sweeney J, Holme S, Heaton W, Nelson E. White cell-reduced platelet concentrates prepared by in-line filtration of platelet-rich plasma. *Transfusion*. 1995;35(2):131-6.

23. Mehrpoori M, Hosseini E, Amini Kafi-Abad S, Ghasemzadeh M. The effect of pre-storage leukoreduction on the levels of expression and shedding of the pro-inflammatory molecule P-Sel in random PRP platelets. *Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ*. 2015;12(2):153-162.

24. Ahmed AS, Leheta O, Younes S. In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates. *Blood Transfusion*. 2010;8(1):28.

25. Solaimani Ferizhandy A, Aghaee Pour M, Pourfatollah A. The Effect of Prestorage Filtration on Platelet Activation in Platelet Concentrates. *Razi*

منابع

1. Hosseini E, Ghasemzadeh M. Different Stages of Platelet Adhesion to the Site of Vascular Injury. *Iranian Journal of Blood & Cancer*. 2012;4(3):133-42.

2. Seghatchian J, Krailadsiri P. Platelet storage lesion and apoptosis: are they related? *Transfusion and Apheresis Science*. 2001;24(1):103-5.

3. Ohto H, Nollet KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfusion and Apheresis Science*. 2011;44(3):321-5.

4. Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. *Transfusion*. 2008;48(7):1469-77.

5. Kaufman J, Spinelli S, Schultz E, Blumberg N, Phipps R. Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(4):788-96.

6. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Review. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001;58(1):4-43.

7. Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circulation Research*. 2001;89(12):1092-103.

8. Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047-54.

9. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-4.

10. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106(8):896-9.

11. Vanichakarn P, Blair P, Wu C, Freedman JE, Chakrabarti S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. *Thrombosis research*. 2008;122(3):346-58.

12. 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.

13. Wang HB, Wang JT, Zhang L, Geng ZH, Xu WL, Xu T, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nature immunology*. 2007;8(8):882-92.

14. Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, et al. Soluble CD40 ligand

Journal of Medical Sciences. 2005;12(45):97-106.

26. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Nguyen KA, Arthaud CA, Eyraud MA, Chavarin P, et al. Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously oversecreted in platelet components associated with acute transfusion reactions. *Transfusion*. 2014; 54(3):613-25.

The effect of pre-storage leukoreduction on the levels of expression of the pro-inflammatory molecule CD40 ligand in random PRP platelets

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

Mehran Ghasemzadeh, Assistant Professor, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.

Ehsan Saraf Kazerooni, MSc, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.

***Ehteramolsadat Hosseini**, Assistant Professor, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran (*Corresponding author).
e.hosseini10@yahoo.com.au

Abstract

Background: Several lines of evidence suggest the role of leukocyte in platelet activation. Since pro-inflammatory mediator CD40 ligand (CD40L) has been considered as a marker of platelet activation that reflecting platelet storage lesion (PSL), we evaluated the effect of leukoreduction processes on thereby the levels of expressed CD40L in Platelet Concentrates (PCs).

Methods: In present study PRP-PCs were subdivided into two groups of usual platelets (non-filtered) and leuko-reduced platelets following pre-storage filtration. Using flow-cytometry method, the levels of platelet CD40L expression were analyzed for each group in day 1, 3 and 5 post-storage.

Results: In non-filtered products, CD40L expression on days 1, 3 and 5 after storage were 35 ± 5.06 , 62 ± 5.84 and 82 ± 6.1 , respectively. CD40L expression showed significant increases in day 3 and 5 after storage compared to day 1 ($p<0.05$). In leuko-reduced platelets, CD40L expression on days 1, 3 and 5 after storage were 24 ± 4 , 41 ± 4 and 51 ± 6 , respectively. While the same increase pattern of CD40L expression was also observed here, the significant difference was just reported between day 1 and 5 ($p<0.05$). Furthermore the leukoreduced platelets showed significantly less CD40L expression in day 3 and 5 compared to non-filtered platelets.

Conclusion: This study has demonstrated that pre-storage leukoreduction of PCs can reduce CD40L expression during platelet storage, the finding that suggests the effect of leukocytes in the promotion of PSL. In addition, considering the importance of CD40L in inflammatory function, it seems leuko-reduced platelet products decrease the adverse effects of platelet transfusion especially in susceptible recipients.

Keywords: CD40 Ligand, Platelet concentrate, Pre-storage leuko-reduction