

## Effects of Platelet Microparticles on the Activation of B Cells

Mohamad Ali Esmaili<sup>1</sup>, Fatemeh Yari<sup>2\*</sup>, Zohreh Sharifi<sup>2</sup>, Mahin Nikougoftar<sup>3</sup>,  
Razieh Fadaei<sup>1</sup>

- 1- M.Sc., High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran
- 3- Ph.D., High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 1449613111, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran  
Email: f.yari@ibto.ir

Received: 22/Dec/2012, Accepted: 19/Feb/2012

### Abstract

**Objectives:** Platelets are anucleated fragments derived from megakaryocytes. It has been demonstrated that platelets play a role in hemostasis and innate immunity. In addition, platelets have a CD40 ligand which is an important molecular marker in motivating immune cells. Thus, platelets also have a role in adaptive immunity as seen by their ability to activate B cells. Since human platelet microparticles (MPs) originate from platelets, we have chosen to examine the effects of MPs on B cell activation.

**Methods:** Platelet MPs were isolated from platelet concentrates obtained from the Tehran Blood Transfusion Center. The MPs were co-cultured with B cells isolated from human whole blood with magnetic beads using negative selection. After seven days, the expression of activation markers CD27 and CD86, as well as IgD were evaluated by flow cytometry.

**Results:** In a comparison between test (B cells/MPs) and control (B cells) cells we observed that the expression of activation markers CD27 and CD86 increased during the seven-day co-culture period. However, the expression of IgD antibody decreased.

**Conclusions:** As with platelets, MPs can affect B cell activation during in vitro co-culture.

**Keywords:** Platelet, Microparticles, B cells, CD27, CD86, IgD

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 1-10

## تأثیر میکروذرات مشتق از پلاکت انسانی بر فعال‌سازی لنفوسیت‌های B

محمدعلی اسماعیلی<sup>۱</sup>، فاطمه یاری<sup>۲\*</sup>، زهره شریفی<sup>۳</sup>، مهین نیکوگفتار<sup>۳</sup>، راضیه فدایی<sup>۱</sup>

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

۲- دانشیار، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، تهران، ایران

۳- دکتری تخصصی، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۴۹۶۱۳۱۱۱، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، تهران، ایران  
Email: f.yari@ibto.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۰۱

دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۰۲

## چکیده

**هدف:** پلاکت‌ها قطعات سلولی بدون هسته و مشتق از مگاکاربوسیت‌ها هستند که علاوه بر ایفای نقش در هموستاز و ایمنی ذاتی به واسطه داشتن شاخص‌های مهم نظیر CD40L (یک شاخص مولکولی مهم در تحریک سلول‌های ایمنی) می‌توانند در ایمنی اکتسابی نیز نقش داشته باشند؛ از جمله تأثیر آن‌ها بر لنفوسیت‌های B و فعال‌سازی آن‌ها مشخص شده است. اکنون در پاسخ به این سؤال که آیا میکروذرات مشتق از غشای پلاکت نیز می‌تواند این تأثیرگذاری را داشته باشد، تأثیر آن‌ها بر فعال‌سازی لنفوسیت‌های B بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** در ابتدا پلاکت کنسانتره از پایگاه انتقال خون منطقه‌ای و آموزشی استان تهران تهیه شدند و میکروذرات از این کنسانتره‌ها جدا شد. سپس این میکروذرات با لنفوسیت‌های B که با استفاده از ذرات مغناطیسی به روش انتخاب منفی از فرآورده‌های خون تازه جدا شده بودند، در محیط کشت مواجه شد. بعد از ۷ روز بیان شاخص‌های فعالیت بر سطح لنفوسیت‌های B با روش فلوسیتومتری بررسی شد.

**نتایج:** مطالعه نشان داد که لنفوسیت‌های B از میکروپارتیکل‌ها تأثیر پذیرفته‌اند به طوری که در روز ۷ کشت همزمان آن‌ها، بیان شاخص‌های CD27 و CD86 در سطح آن‌ها افزایش و در عین حال بیان شاخص IgD در آن‌ها کاهش یافته است. **نتیجه‌گیری:** میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت همانند پلاکت‌ها بر فعال‌سازی لنفوسیت‌های B تأثیر دارد.

کلیدواژگان: میکروذرات پلاکتی، لنفوسیت B، CD27، CD86، IgD

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات: ۱-۱۰

## مقدمه

در دهه ۱۸۸۰ بیروزرو (Bizzozero) و هایم (Hayem) که مستقل از یکدیگر کار می‌کردند در خصوص ذراتی که قبلاً از نظر دیگران به عنوان اجسام کروی بی‌رنگ و کوچک‌تر از گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز توصیف شده بود، مطالبی ارائه کردند و آن‌ها را هماتوبلاست (Hematoblast) یا پلاکت (Platelets) نامیدند [۱]. پلاکت‌ها قطعات سلولی بدون هسته

هستند که از مگاکاربوسیت‌ها (Megakaryocytes) به وجود آمده و نقش آن‌ها در هموستاز (Homeostasis) به خوبی شناخته شده است [۲، ۳]. پلاکت‌ها از طریق رهاسازی موادی که با لوکوسیت‌ها (Leukocytes) و دیواره سلول‌های اندوتلیال واکنش می‌نمایند در فرآیند التهاب شرکت می‌کنند [۴]. همچنین میان‌کنش پلاکت‌ها با نوتروفیل‌ها (Neutrophils) سبب فراخوانی نوتروفیل‌ها به محل التهاب

## فعال سازی لنفوسیت‌های B به وسیله میکروذرات پلاکتی

آترواسکلروز (Atherosclerosis) نقش دارد [۱۱]. میکروذرات همانند CD40L محلول در طول مدت نگهداری فرآورده‌های خونی تجمع می‌یابد [۱۲]. عمده میکروذرات موجود در پلاسما از پلاکت‌ها مشتق می‌شود [۹-۱۳]. در کل میکروذرات پلاکتی به طور طبیعی در خون افراد سالم گردش می‌کند و در ایجاد هموستاز انجام وظیفه می‌کند [۳]. نشان داده شده که میکروذراتی که از ضایعات آترواسکلروز جدا شده‌است، شاخص CD40L را بر سطح خود بیان کرده و از طریق جفت شدن با CD40 بر سطح سلول‌های اندوتلیال می‌تواند باعث آنژیوژنز در بدن شود [۱۴].

گزارش‌های محدودی وجود دارد مبنی بر این که پلاکت‌ها به واسطه داشتن شاخص‌هایی از قبیل CD40L در ایمنی اکتسابی شرکت نموده و می‌تواند باعث افزایش تولید آنتی‌بادی از سلول‌های B و فعال‌سازی شاخص‌های خاطره‌ای آن‌ها شوند [۴]. با توجه به این که میکروذرات مشتق از پلاکت نیز شاخص‌های سطحی پلاکت را بر سطح خود بیان می‌کند، در این مطالعه سعی بر این شد تا تأثیر میکروپارتنیکل‌های مشتق از پلاکت بر فعال‌سازی سلول‌های B و افزایش یا کاهش نشانگرهای فعالیت آن‌ها بررسی شود. چنانچه این تأثیرگذاری وجود داشته باشد می‌توان به میکروذرات پلاکتی در آینده به عنوان مولکول‌های بالقوه در تنظیم فعالیت لنفوسیت‌های B توجه نموده و این مطالعه به عنوان یک مطالعه مقدماتی در این رابطه مطرح خواهد بود.

## مواد و روش‌ها

در ابتدا فرآورده خون تازه و پلاکت کنسانتره (۴ نمونه از هریک) از اهداکنندگان خون مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون منطقه‌ای و آموزشی استان تهران به شکل تصادفی تهیه شد و هیچ انتخابی در مورد گروه خونی کیسه‌های پلاکت انجام نشد. لازم به ذکر است آزمایش‌های غربالگری ویروسی [HIV (Human Immunodeficiency Virus)، HCV (Hepatitis

می‌شود [۵].

با این وجود شواهد فزاینده‌ای از مطالعات اخیر نشان می‌دهد که پلاکت‌ها در پاسخ‌های ایمنی اکتسابی نیز نقش دارند. در این زمینه مشخص شده که پلاکت‌ها موجب فعال شدن سلول دندریتیک (Dendritic Cells)، افزایش پاسخ سلول‌های T، القای تولید آنتی‌بادی IgG از سلول‌های B و افزایش شکل‌گیری مراکز زیبا در هماهنگی با سلول‌های T می‌شوند [۶]. گزارش‌ها بیانگر آن است که شاخص CD40L بر سطح پلاکت‌ها بیان می‌شود و همچنین CD40L محلول (sCD40L) متعاقب فعال شدن پلاکت‌ها از آن‌ها آزاد می‌شود. از آنجا که تعداد پلاکت‌ها در خون محیطی زیاد است، عمده CD40L محلول در پلاسما از پلاکت‌ها مشتق می‌شود. غلظت بالای CD40L محلول در فرآورده‌های پلاکتی ممکن است توجیهی برای واکنش‌های نامساعد و تب‌زای ناشی از تزریق کنسانتره‌های پلاکتی باشد [۴]. اعتقاد بر این است که CD40L محلول در فرآورده‌های پلاکت طی زمان ذخیره به مدت ۳ تا ۵ روز افزایش می‌یابد [۷].

میکروذرات (Microparticles) مشتق از پلاکت اولین بار در سال ۱۹۶۷ توسط شخصی به نام ولف (Wolf)، غبار پلاکتی نامیده شد [۸]. به طور کلی میکروذرات از انواع سلول‌ها شامل لوکوسیت‌ها، ایتروسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های سرطانی گوناگون پدید می‌آید [۹]. میکروذرات جمعیت ناهمگونی از ساختارهای کروی با قطر ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر است که طی فرآیند اکتوسیتوز (Ectocytosis) از غشای پلاسمایی سلول اولیه جوانه می‌زنند و در عین حال آنتی‌ژن‌های خاص سلول اولیه را بر سطح خود بیان می‌نمایند [۱۰]. طبیعتاً میکروذراتی که از پلاکت مشتق می‌شود بسیاری از شاخص‌های موجود بر سطح پلاکت نظیر CD41، CD61، CD40L، CD62 و ... را بیان می‌کنند. این میکروذرات به پاسخ‌های هموستاتیک و التهابی، ترمیم عروق و آنژیوژنز (Angiogenesis)، بقای سلولی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده کمک می‌کنند و به خوبی مشخص شده که در

(C Virus) و (Hepatitis B Virus) HBV] روی فرآورده‌های خونی تهیه شده تکمیل شده بود.

## آماده‌سازی میکروذرات و بررسی بیان شاخص CD40L بر سطح آن‌ها

در ابتدا میکروذرات موجود در فرآورده‌های پلاکتی (از پایگاه انتقال خون تهران تهیه شد) با استفاده از سانتریفوژ در حداقل سه دور متوالی جدا شد (دور ۱۵۰g به مدت ۱۵ دقیقه برای جداسازی و رسوب گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها؛ دور ۱۲۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه برای جداسازی و رسوب هر چه بیشتر پلاکت‌ها و سلول‌های باقیمانده؛ دور ۱۶۰۰۰g به مدت یک ساعت برای رسوب میکروذرات). پس از به‌دست آوردن رسوب میکروذاره‌ای از فرآورده‌های پلاکت، برای بررسی بیان شاخص CD40L بر سطح آن‌ها از روش فلوسیتومتری استفاده شد. در لوله میکروتیوب ۳ میکرولیتر آنتی CD40L به میکروذرات پلاکتی اضافه شد. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای یخچال، میکروذرات با بافر فسفات سالیین (Phosphate Buffered Saline: PBS) شستشو داده شد. در مرحله بعد به لوله میکروتیوب مقدار ۳ میکرولیتر از آنتی‌بادی لایه دوم ویژه IgG موشی و کونژوگه با FITC اضافه شد و دوباره انکوباسیون برای ۴۵ دقیقه در دمای یخچال انجام گرفت. در مرحله آخر پس از شستشو با PBS و خالی کردن مایع رویی برای بررسی بیان CD40L از روش فلوسیتومتری استفاده شد. برای اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها از کنترل ایزوتیپ استفاده شد.

## تهیه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با به‌کارگیری فایکول

برای جداکردن لنفوسیت‌های B از فرآورده خون تازه، از روش انتخاب منفی (Negative Selection) استفاده شد. در ابتدا با به‌کارگیری فایکول سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

(Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMCs) به‌دست آمد. سپس با استفاده از ذرات مغناطیسی (Magnetic Bead) تخلیص سلول‌های B انجام گرفت. روش کار در زیر آمده است.

نمونه خون تازه با PBS استریل به نسبت یک به یک رقیق شد. سپس ۶ لوله فالكون ۱۵ میلی‌لیتری را آماده نموده و در هر کدام از آن‌ها ابتدا ۵ میلی‌لیتر فایکول و سپس به آرامی ۷ میلی‌لیتر خون رقیق شده از جداره لوله ریخته شد (به نحوی که با فایکول مخلوط نشود). لوله‌های فالكون به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد (۵ دقیقه اول با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه و ۲۵ دقیقه دوم با سرعت ۲۲۰۰ دور در دقیقه). در این روش سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از گرادپانت شیب غلظت جدا شدند. لایه بافی‌کوت حاوی سلول‌های تک هسته‌ای در هر یک از لوله‌های فالكون به کمک پیپت پاستور به آرامی و به طور کامل از سایر لایه‌ها جدا و به یک لوله فالكون دیگر منتقل شد. سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای دو مرتبه با بافر PBS شسته شد. برای شستشو از سانتریفوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. رسوب حاصل دارای سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) بود. تمامی مراحل کار تا زمان تعیین خلوص لنفوسیت‌های B در شرایط استریل انجام گرفت.

حذف سلول‌های T، سلول‌های NK (Natural Killer Cells) و مونوسیت‌ها به ترتیب با استفاده از anti-CD3، anti-CD16 و anti-CD14 صورت گرفت.

در تخلیص به روش منفی، ۱۰ میکرولیتر از anti-CD16، ۵ میکرولیتر از anti-CD3 و ۳۰۰ میکرولیتر از anti-CD14 را به لوله فالكون دارای سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۴۰ دقیقه در دمای یخچال صورت گرفت. پس از انکوباسیون، ۲۰۰ میکرولیتر از ذرات مغناطیسی پوشیده شده با آنتی‌بادی (goat anti-mouse IgG) به لوله فالكون اضافه و برای مدت ۴۰ دقیقه در دمای یخچال قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون دوم، لوله

## فعال سازی لنفوسیت های B به وسیله میکروذرات پلاکتی

خانه‌ای از محیط کشت RPMI واجد ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum)، ۱ میلی‌لیتر محیط L-گلوتامین و ۱ میلی‌لیتر محیط P&S [۱۰۰۰] واحد پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰ میلی‌گرم استرپتومایسین (Streptomycin)] استفاده شد. تعداد لنفوسیت B ( $1 \times 10^6$  در میلی‌لیتر) و غلظت میکروذره (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای در نظر گرفته شد.

در چاهک آزمون، میکروذره به همراه لنفوسیت B به محیط کشت اضافه شد. در چاهک کنترل منفی، تنها لنفوسیت B به محیط کشت اضافه شد.

در این مرحله نمونه‌ها از نظر شاخص‌های فعالیت لنفوسیت B با به‌کارگیری آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد شاخص‌های CD86، CD27 و نیز از نظر وجود IgD با استفاده از فلوسیتومتری بررسی شد و برای اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها از کنترل ایزوتیپ استفاده شد. این آزمایش ۴ بار و هر بار به صورت دوتایی انجام پذیرفت.

## تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده به وسیله نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون آماری paired sample T-test تجزیه و تحلیل شد.

## نتایج

### بررسی بیان CD40L روی میکروذرات حاصل

#### با استفاده از روش فلوسیتومتری

بررسی نشان داد که بر سطح میکروذرات نیز شاخص CD40L بیان می‌شود چرا که میکروذرات از غشای پلاکت منشا می‌گیرد و پلاکت‌ها CD40L را بیان می‌کنند. درصد بیان این شاخص از حدود ۴۰ درصد تا حدود ۴۸ درصد به‌دست آمد (میانگین  $4 \pm 44$  درصد).

فالکون در محیط مغناطیسی قرار داده شد تا بیدهای مغناطیسی که به سلول‌های واجد آنتی‌بادی متصل هستند به دیواره‌های لوله فالکون جذب شود. در این حالت بیشتر سلول‌های باقیمانده لوله فالکون لنفوسیت‌های B بودند.

## بررسی خلوص سلول‌های B با استفاده از anti-

### CD19 (روش فلوسیتومتری)

پس از تخلیص لنفوسیت B از رسوب PBMC، به سوسپانسیون سلول‌های B، ۳ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد CD19 اضافه شد. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای یخچال، لوله‌های میکروتیوب با PBS شستشو داده شد. در مرحله بعد به لوله میکروتیوب به مقدار ۳ میکرولیتر از آنتی‌بادی لایه دوم (آنتی‌بادی ضد IgG موشی گونژوگه با FITC) اضافه نموده و دوباره انکوباسیون برای ۴۵ دقیقه در دمای یخچال انجام گرفت. در مرحله آخر لوله میکروتیوب با PBS شستشو و پس از خالی کردن مایع رویی برای بررسی بیان CD19 از روش فلوسیتومتری استفاده شد. برای اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها از کنترل ایزوتیپ استفاده شد.

## مواجهه سلول‌های B با میکروذرات پلاکتی در

### شرایط کشت و نگهداری تا ۷ روز

قبل از مواجهه کردن سلول‌های B با میکروذرات تعداد سلول‌های B و همچنین غلظت میکروذرات محاسبه شد. غلظت پروتئینی میکروذره حاصل با به‌کارگیری استاندارد پروتئین (Bovine Serum Albumin: BSA) و پس از طی مراحل رقیق کردن با استفاده از روش برادفورد (Bradford) سنجیده شد.

مواجهه سلول‌های B با میکروذرات پلاکتی در شرایط کاملاً استریل صورت گرفت. برای کشت در پلیت‌های ۲۴

## بررسی خلوص سلول‌های B حاصل با استفاده

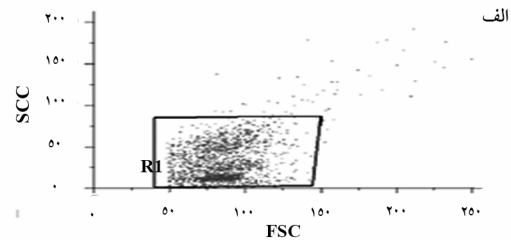
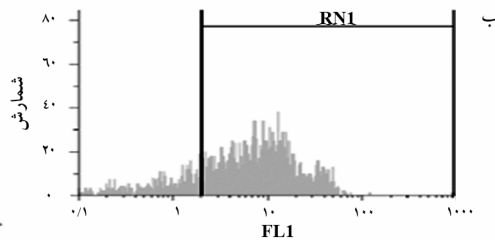
### از Anti-CD19

درصد بیان CD19 بر سطح سلول‌های B پس از بررسی نمونه حاوی لنفوسیت B با استفاده از روش فلوسایتومتری بین ۸۷ تا ۹۲ درصد به دست آمد. همان‌طور که پیش از این گفته شد تخلیص سلول‌های B از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به روش انتخاب منفی انجام گرفت. نتیجه حاصل در

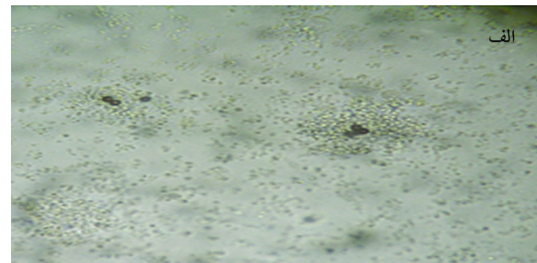
شکل ۱ مشاهده می‌شود.

### بررسی میکروسکوپی

بررسی میکروسکوپی نشان داد برهمکنش بین میکروذره و لنفوسیت B در چاهک‌های آزمون روی داده است. تصاویر میکروسکوپی برهمکنش سلول‌های B با میکروذرات در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱ مطالعه بیان CD19 بر سطح لنفوسیت‌های B با استفاده از روش فلوسایتومتری؛ (الف) نمودار جمعیت لنفوسیت‌های B، (ب) نمودار بیان CD19 بر سطح لنفوسیت‌های B



شکل ۲ (الف) تصویر میکروسکوپی مربوط به برهمکنش لنفوسیت B با میکروذرات مشتق از پلاکت در چاهک مربوط به آزمون (لنفوسیت B+ میکروذره) با بزرگنمایی ۱۰×؛ اجتماع میکروذرات به دور لنفوسیت‌های B به خوبی مشاهده می‌شود. تجمع میکروذرات با یکدیگر نیز واضح است. (ب) تصویر میکروسکوپی برهمکنش بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین

IgD (به روش فلوسایتومتری) در روز ۷ مواجه نمودن لنفوسیت B و میکروذره پلاکتی مشخص شد که در سلول‌های B مجاور شده با میکروذرات، در مقایسه با سلول‌های B تنها، CD27 از  $6 \pm 1/63$  درصد به  $37 \pm 1/41$  درصد (شکل ۳) و CD86 از  $4/5 \pm 1/29$  درصد به  $18 \pm 4/32$  درصد افزایش داشته است. در حالی که بیان IgD در کشت توأم سلول‌های B مجاور شده با

## بررسی بیان نشانگرهای فعالیت سلول‌های B با

### انجام فلوسیتومتری برای نشانگرهای CD27،

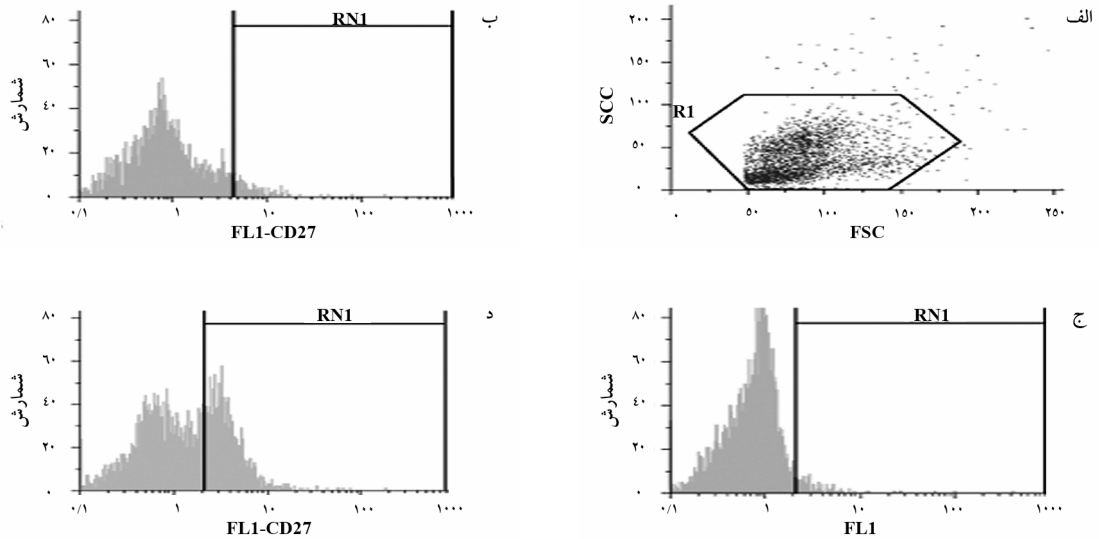
### CD86 و همچنین شاخص IgD

پس از بررسی نشانگرهای فعالیت سلول‌های B با انجام فلوسیتومتری برای شاخص‌های CD27، CD86 و شاخص

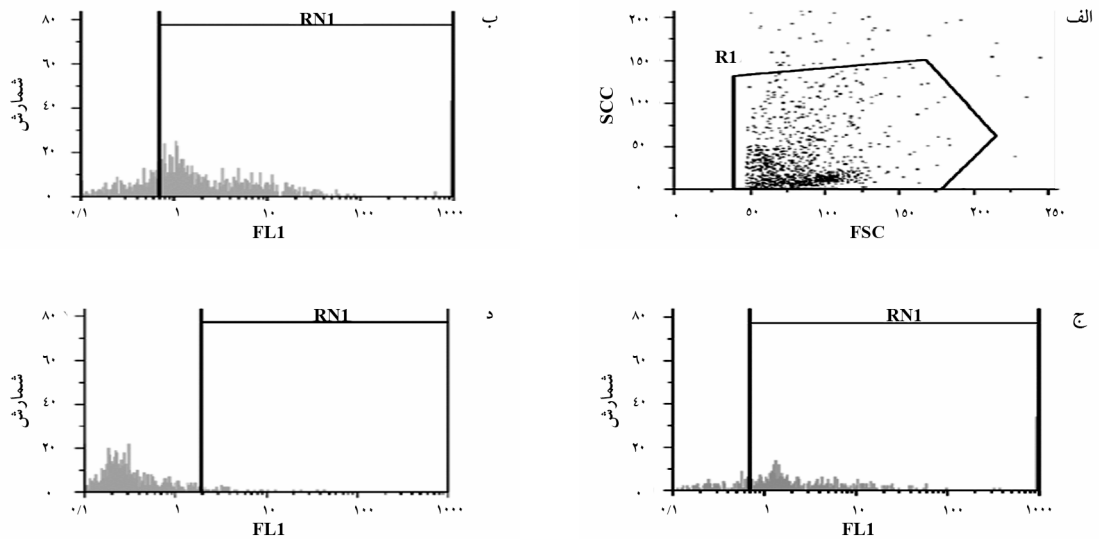
**فعال سازی لنفوسیت‌های B به وسیله میکروذرات پلاکتی**

(شکل ۴). اختلاف‌ها در مورد تمامی پارامترها بین شرایط حضور میکروذره و بدون آن معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

میکروذرات در مقایسه با سلول‌های B که به تنهایی کشت شده بود، از  $81 \pm 10/8$  درصد به  $32 \pm 7/07$  درصد کاهش داشت



**شکل ۳** مطالعه درصد بیان شاخص خاطره‌ای CD27 بر سطح لنفوسیت‌های B با استفاده از روش فلوسیتومتری ۷ روز بعد از مواجهه‌سازی در محیط کشت: (الف) نمودار جمعیت لنفوسیت‌های B، (ب) نمودار بیان شاخص CD27 بر سطح لنفوسیت‌های B مربوط به نمونه کنترل منفی (سلول B تنها)، (ج) نمودار کنترل ایزوتیپ، (د) نمودار بیان شاخص CD27 بر سطح لنفوسیت‌های B در نمونه آزمون (سلول B+ میکروذره) ۷ روز پس از مواجهه با میکروذرات پلاکتی. افزایش بیان شاخص خاطره‌ای CD27 در نمونه آزمون (د) نسبت به نمونه کنترل منفی (ب) ملاحظه می‌شود.



**شکل ۴** مطالعه درصد بیان شاخص خاطره‌ای IgD بر سطح لنفوسیت‌های B با استفاده از روش فلوسیتومتری، ۷ روز بعد از مواجهه‌سازی در محیط کشت: (الف) نمودار جمعیت انتخاب شده لنفوسیت‌های B، (ب) نمودار بیان شاخص IgD بر سطح لنفوسیت‌های B مربوط به نمونه کنترل منفی (سلول B تنها)، (ج) نمودار بیان شاخص IgD بر سطح لنفوسیت‌های B در نمونه آزمون (سلول B+میکروذره)، (د) نمودار کنترل ایزوتیپ

## بحث

بسیاری از سلول‌ها از جمله پلاکت‌ها، لوکوسیت‌ها، اریتروسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال، قطعات کوچکی را از غشای پلاسمایی خود به گردش خون آزاد می‌کنند که بین ۰/۱ تا ۱ میکرون قطر دارد. اثبات شده این قطعات ریز که میکروذره نیز نامیده می‌شود نقش‌های فیزیولوژیک مهمی بر عهده دارد. میکروذرات پلاکتی فراوان‌ترین میکروذرات در گردش خون است به طوری که ۷۰ تا ۹۰ درصد از آن‌ها را به خود اختصاص می‌دهد [۱۵]. انتقال پیام از طریق وزیکول‌های غشایی پلاکت‌ها انجام شده و محدود به پلاکت‌ها نمی‌شود [۱۶] به عنوان مثال وزیکول‌های آزاد شده از سلول‌های اندوتلیال مونوسیت‌ها را فعال کرده و روند چسبندگی (Adhesion) را پیش می‌برد [۱۷]. وزیکول‌های سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های B نیز روند عرضه آنتی‌ژن را افزایش می‌دهد [۱۸]. همچنین نشان داده شده که وزیکول‌های مشتق از سلول‌های ماست سل (Mast Cells) نیز دارای انواعی از مولکول‌های تنظیم کننده ایمنی از جمله CD40L است. وزیکول‌های مشتق از سلول‌های ماست سل قادر است هم لنفوسیت‌های B و هم لنفوسیت‌های T را فعال نمایند [۱۹].

در این مطالعه سعی بر این شد تا تأثیر میکروذرات مشتق از پلاکت بر فعال شدن لنفوسیت‌های B بررسی شود. اساس کار بررسی حاضر بر طبق مطالعه‌ای بود که در سال ۲۰۰۷ توسط کوگناسه (Cognasse) و همکارانش در کشور فرانسه انجام شد. در این مطالعه مشخص شد که مواجه نمودن پلاکت‌ها با لنفوسیت‌های B در محیط کشت باعث فعال شدن این سلول‌ها و افزایش شاخص‌های خاطره‌ای آن‌ها همانند CD86، CD27 و افزایش تولید آنتی‌بادی‌های IgM، IgG و IgA از آن‌ها می‌شود [۴]. در همخوانی با این پژوهش نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد که مواجهه میکروذرات مشتق از پلاکت‌ها در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با لنفوسیت‌های B در محیط کشت و در شرایط مطلوب موجب افزایش بیان آن شاخص‌ها می‌شود.

مطالعه دیگری که در این زمینه صورت گرفت، بررسی تأثیر پیام‌دهی میکروذرات غشایی مشتق از پلاکت بر ایمنی اکتسابی موش از طریق CD40L در سال ۲۰۰۸ به وسیله اسپراگو (Sprague) و همکارانش انجام شد. در این مطالعه مشخص شد که میکروذرات غشایی مشتق از پلاکت، شکل‌گیری مراکز زایا را در شرایط درون بدنی (In vivo) به واسطه پیام CD40L القا می‌نماید. علاوه بر این؛ به منظور تعیین این‌که آیا PDMV ها مستقیماً با لنفوسیت‌های B برهمکنش می‌کند، میکروذرات غشایی مشتق از پلاکت در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) با لنفوسیت‌های B کشت داده شد و مشخص شد که تکثیر لنفوسیت‌های B القا می‌شود اما تکثیر به صورت ضعیف روی می‌دهد [۲].

در مطالعه کوگناسه و همکاران کاهش چشمگیری در شاخص IgD سلول B (۷۶/۳ درصد به ۴۷/۸ درصد) و افزایش چشمگیر در شاخص CD27 سلول B (۲۰/۵ درصد به ۳۲ درصد) به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده برای شاخص‌های خاطره‌ای در مطالعه حاضر و کوگناسه همخوانی داشت. مشخص شد که بیان شاخص CD27 روی سلول B نسبت به کنترل منفی از ۶ درصد به ۳۷ درصد و CD86 از ۴/۵ درصد به ۱۸ درصد افزایش داشته است در حالی‌که بیان IgD بر سلول B نسبت به کنترل منفی از ۸۱ درصد به ۳۲ درصد کاهش نشان داد. این همخوانی نشان داد که میکروذرات مشتق از پلاکت نیز همانند پلاکت‌ها عمل می‌نمایند و می‌تواند موجب فعال‌سازی شاخص‌های خاطره‌ای (افزایش بیان شاخص‌های CD27 و CD86 و کاهش بیان شاخص IgD) شود [۴].

در ادامه می‌توان به بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف این میکروذرات در تولید آنتی‌بادی از لنفوسیت‌های B پرداخت.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از سازمان انتقال خون ایران به دلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌شود.



- [1] Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(9): 1381-9.
- [2] Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 2008; 111(10): 5028-36.
- [3] Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 2009; 113(5): 1112-21.
- [4] Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Chavarin P, Cogné M, Richard Y, Garraud O. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp Hematol* 2007; 35(9): 1376-87.
- [5] Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007; 21(2): 99-111.
- [6] Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, Stein CS, Nieswandt B, Wang Y, Davidson BL, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003; 19(1): 9-19.
- [7] Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, Gettings KF, McLaughlin NJ, Silliman CC. Soluble CD40 ligand 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.
- [8] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13(3): 269-88.
- [9] Siljander PR. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res* 2011; 127 Suppl 2: S30-3.
- [10] Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107(9): 1047-57.
- [11] Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; 98(10): 3143-9.
- [12] Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood Transfus* 2010; 8 Suppl 3: s31-8.
- [13] Italiano JE Jr, Mairuhu AT, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol* 2010; 17(6): 578-84.
- [14] Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Lesèche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A, Boulanger CM.

- CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(16): 1302-11.
- [15] Chernoff A, Snyder EL. The cellular and molecular basis of the platelet storage lesion: a symposium summary. *Transfusion* 1992; 32(4): 386-90.
- [16] Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1655-62.
- [17] Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002; 99(11): 3962-70.
- [18] Segura E, Amigorena S, Théry C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35(2): 89-93.
- [19] Skokos D, Botros HG, Demeure C, Morin J, Peronet R, Birkenmeier G, Boudaly S, Mécheri S. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol* 2003; 170(6): 3037-45.