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

فاطمه نساجی
مهران قاسم‌زاده
زینب پیر محمد جماعت
احترام‌السادات حسینی*

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

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

چکیده

زمینه و هدف: Platelet receptor glycoprotein Ibα (GPIbα) از کمپلکس رسپتوری GPIb-IX-V و Platelet glycoprotein VI (GPVI) از جمله مهمترین گیرنده‌های پلاکتی هستند که در فرایند تشکیل لخته دخیل می‌باشند. GPIbα در شروع فرایند تشکیل لخته در شرایط جریان خون سرخرگی نقشی اساسی دارد در حالی‌که GPVI فارغ از میزان شدت جریان خون عروقی، در چسبندگی پایدار پلاکت‌ها دخالت می‌نماید. از آنجایی‌که افزایش زمان نگهداری تاثیرات سویی بر عمکرد 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 به‌مدت پنج روز نگهداری شدند و سطوح بیان GPIbα و GPVI در آن‌ها برحسب مقادیر میانگین شدت فلورسانس با فلوسایتومتری سنجیده شد.

یافته‌ها: میزان بیان GPIbα در روز اول (Mean fluorescence intensity, MFI= ۸۶±۵/۹) بود که در روز سوم به (MFI= ۶۹±۶/۹) کاهش (P=۰/۰۱۶) و در روز پنجم نیز به (MFI= ۶۱±۷/۷) کاهش یافت (P=۰/۰۰۹۴). بیان گیرنده GPVI نیز بر اساس MFI در روزهای یک، سه و پنج به‌ترتیب ۲۰/۶±۳/۳، ۲۴±۲/۵ و ۱۴±۴/۹ بود که در روز پنجم نسبت به روز سوم با تفاوت معناداری کاهش یافت (P=۰/۰۲۱۳).

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

کلمات کلیدی: فعالیت پلاکتی، گیرنده چسبندگی، گلیکوپروتین VI غشای پلاکتی، GPIbα، پلاسمای غنی از پلاکت، ترومبوز.

*نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شیخ فضل‌اله نوری، تقاطع بزرگراه شهید همت، جنب برج میلاد، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تلفن: ۳-۸۸۶۰۱۵۷۲ -۰۲۱
E-mail: e.hosseini10@yahoo.com.au

مقدمه

پلاکت‌های خون، فراگمان‌های سلولی بدون هسته و کوچکی هستند که نقش اساسی در هموستاز بازی می‌کنند.[1] 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 تاثیر 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.[2] ابتدای فرایند آسیب نگهداری پلاکت همراه با تغییر شکل پلاکت از دیسکوییدی به اسفرویدی است که ناشی از افزایش جزیی در میزان کلسیم پایه داخل سلولی می‌باشد.[3] شرایط نامطلوب و یا طولانی شدن زمان نگهداری،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

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 pO_2 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، کلاسترینگ زیرواحد GPIbα، 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 GPIbα همراه با آزاد شدن وزیکول‌ها منجر می‌شود که در پی آن می‌تواند اثرات سویی در بقا و عملکرد بهینه این سلول‌ها پس از تزریق فراورده 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.[۵و۶]

از آنجایی‌که مطالعات انجام شده گویای ارتباط مستقیم مابین بیان گیرنده GPVI با گیرنده‌های CD62P و GPIbα است[۷] بنابراین به‌نظر می‌رسد در خلال نگهداری فراورده‌های 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 GPIbα 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 αIIbβ3 و اتصال آن به فیبرینوژن موجبات تجمع پلاکتی و توسعه و پایداری لخته را فراهم خواهد نمود.

هرچند گیرنده GPIbα 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 GPIbα و هم در شرایط Low shear (به‌صورت انحصاری) در چسبندگی پلاکت نقش دارد، اساسی و مضاعف خواهد بود.[۸] مجموعه GPIb-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 GPIbα, GPIbβ, GP IX و GPV است که همه چهار زیرواحد دارای یک نوع موتیف ساختاری توالی LRR خارج سلولی با موقعیت‌های لوسینی حفظ شده می‌باشند.[۱۰]

GPIbα (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.[۱۲و۱۳] GPIb-V-IX علاوه بر وظیفه چسبندگی، به‌عنوان انتقال‌دهنده پیام نیز عمل می‌کند و این کار را با فعال کردن و افزایش تمایل اینتگرین αIIbβ3 به لیگاند خود انجام می‌دهد،[۱] همچنین GPIbα یک عامل تنظیم‌کننده بسیار قوی در بقای in vivo پلاکت‌ها می‌باشد، چرا که استفاده از آنتی‌بادی‌هایی که سبب القای کلاسترینگ 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 GPIb-V-IX در حین نگهداری پلاکت به‌دلیل فعالیت متالوپروتئینازهای غشایی و کاهش بیان GPIbα 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 (Alborhagin) را نام برد.[۸] آگونیست‌ها می‌توانند کلاسترینگ مولکول‌های GPVI موجود در سطح پلاکت را القا نموده و منجر به تجمیع مولکول‌های سیگنالی در مجاورت همدیگر شوند.[۱۶] پژوهش کنونی با هدف بررسی الگوی بیان گیرنده‌های GPVI و GPIbα در خلال نگهداری پلاکت‌ها انجام گردید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

روش بررسی

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 ۱۳۹٤ 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 GPVI و GPIbα 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 فراورده پلاکتی) مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش برای تهیه پلاکت کنترل مرجع، ابتدا کیسه خون به‌مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. سپس در دور سبک ۳۰۰ g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و پلاسمای سرشار از پلاکت (PRP) از رسوب RBC جدا گردید. در مرحله بعد در دور ۱۷۰۰ g به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شده و پلاسمای 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 فراورده 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 آژیتاتور پلاکتی انکوباتودار و در دمای ۲۵ °C نگهداری گردیدند. نمونه‌های حاصل از این سه بخش در روزهای متوالی یک، سه و پنج پس از نگهداری بررسی شدند.

فراورده PRP را با دور ۱۷۰۰g به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ کرده و پلاسمای رویی فاقد پلاکت (PPP) دور ریخته و سپس رسوب پلاکتی را سوسپانسیون دوباره کردیم. برای فلوسایتومتری سوسپانسیون پلاکتی با شمارش 3×10^{7}/ml تهیه گردید.[۱۷] در لوله‌های اپندرف پلاکت‌ها با آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل FITC Mouse IgG1 Isotype Control Antibody (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) و یا آنتی‌بادی ضد GPIbα (FITC Mouse Anti-human CD42b, BD 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 به‌ترتیب جهت دسترسی به بالاترین سطح فعالیت و آپوپتوز پلاکتی، به‌مدت حداقل ٤۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه گردیده و پس از طی زمان انکوباسیون پلاکت‌ها با پارافرمالدیید 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 HY101BD (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 به‌مدت ٤۵ 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 تایرود 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 به‌مدت 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 پارافرمالدیید به‌عنوان فیکساتور پلاکتی عمل

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

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 رنگ‌آمیزی‌شده با آنتی‌بادی علیه CD42b (گیرنده GPIbα) مشخص گردید و به‌منظور اطمینان از عملکردی بودن پلاکت‌ها، بیان پایه P-selectin پلاکت در فراورده‌های روز اول و همچنین میزان بیان این رسپتور در پاسخ به آگونیست‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این خصوص به‌دنبال انکوباسیون پلاکت‌ها با آنتی‌بادی منوکلونال ضد گیرنده GPIbα (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 GPIbα 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.

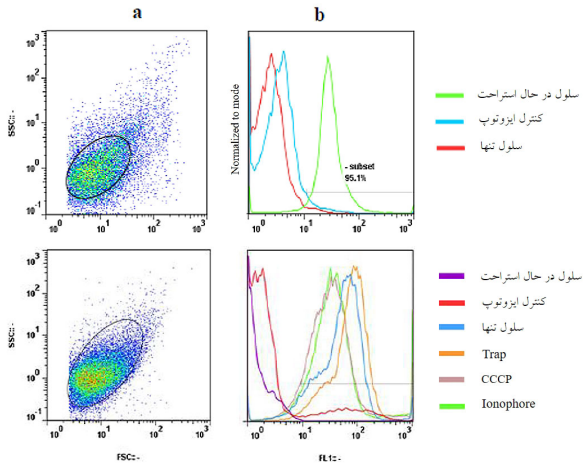
آنالیز داده‌های فلوسایتومتری از طریق محاسبه‌ی درصد (Percentage of gated) جهت مطالعه بیان رسپتور P-selectin و میانگین شدت فلورسانس (Mean fluorescence intensity, MFI) جهت مطالعه بیان رسپتورهای GPIbα و GPVI انجام پذیرفت.

در این مطالعه به‌منظور 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<۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

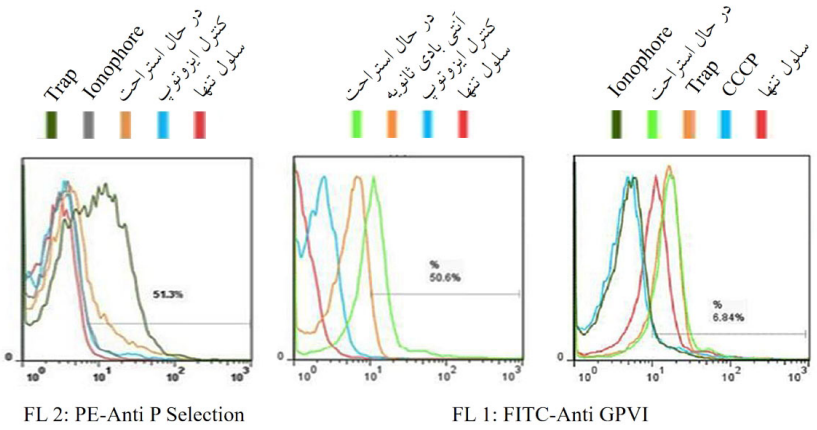
در محدوده انتخاب شده جمعیت پلاکتی، میانگین میزان بیان GPIbα در روز تهیه نمونه کنترل، بر حسب MFI، ۹۱±۸/۳ بود (Mean±SD). در این آزمایشات میزان بیان GPIbα در نمونه کنترل، در حال استراحت و به‌دنبال تیمار با آگونیست‌های مختلف (Trap, Ionophore, CCCP) آنالیز گردید (نمودار ۱). میانگین میزان بیان GPVI نیز در روز تهیه نمونه کنترل، بر حسب MFI، ۲۳±٤/۰۳ بود (Mean±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 GPIbα در روز اول (۸٦±٥/۹) نشان داده شد (Mean±SD) که در روز سوم به‌علت از دست دادن رسپتور GPIbα (ریزش و یا میکروپارتیکلیشن) به‌میزان (٦۹±٦/۹) کاهش یافت هرچند معنادار نبود. در روز پنجم نیز نسبت به روز سوم این کاهش ادامه یافت (٦۱±۷/۷) که البته تفاوت معنادار نبود، ولیکن به‌طور کلی از روز ۱ تا ٥ با کاهش معناداری با P=۰/۰۰۹٤ روبرو بودیم (نمودار ۳-الف).

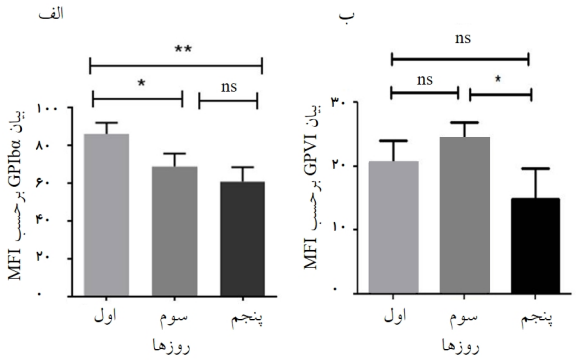


نمودار ۱: الف) نمودارهای پراکندگی (a) و بافتی (b) بیان گیرنده GPIbα، ب) نمودار بافتی میزان بیان GPIbα در روز اول نگهداری در پلاکت در حال استراحت و پلاکت تحریک‌شده با آگونیست‌ها

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

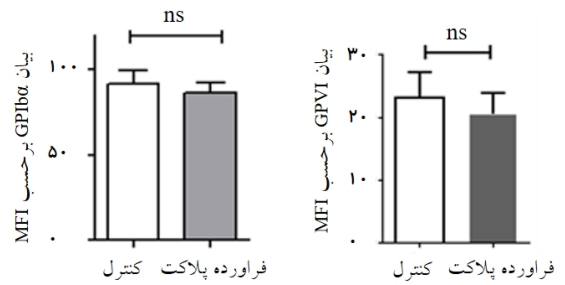


نمودار ۲: الف) بیان P-selectin در نمونه پلاکتی در حال استراحت در روز اول و در پاسخ به آگونیست‌ها، ب) بیان GPVI در پلاکت‌های در حال استراحت، ج) بیان آن در پاسخ به آگونیست‌ها



نمودار ۳: تغییرات بیان GPIbα الف) و GPVI، ب) در حین نگهداری پلاکت

ns: معنادار نمی‌باشد (no significant)، * اختلاف با P<۰/۰۵ معنادار می‌باشد، ** اختلاف با P<۰/۰۱ معنادار می‌باشد



نمودار ٤: مقایسه بیان GPIbα و GPVI در فراورده پلاکتی روز اول و نمونه پلاکتی کنترل

ns: معنادار نمی‌باشد (No significant)

در فراورده پلاکتی کنسانتره، سطوح بیان گیرنده GPVI بر حسب MFI در روزهای یک، سه و پنج به‌ترتیب (۳/۳±۲۰/٦)، (۲/۵±۲٤/۳) و (٤/۹±۱٤/۸) بود (Mean±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=۰/٦٥٦). به‌دنبال آن بیان گیرنده در روز پنجم نسبت به روز سوم با تفاوت معناداری کاهش می‌یابد (P=۰/۰۲۱۳).

مطالعات آماری نشان داد که با استفاده از داده‌های MFI در روز اول تفاوت معناداری از نظر بیان GPIbα و GPVI بین نمونه‌های پلاکت با انتخاب تصادفی (راندم) با نمونه کنترل، وجود ندارند (نمودار ٤).

بحث

بر اساس بررسی‌های به‌عمل آمده بر روی فراورده‌های پلاکتی،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

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،[۱۸و۱۹] میزان بیان گیرنده چسبندگی GPIbα در حین نگهداری فراورده پلاکتی نیز در بیشتر این مطالعات به‌عنوان یکی دیگر از شاخص‌های ارزیابی آسیب نگهداری پلاکت مورد توجه قرار گرفته است.[۲۰]

مطالعه میزان بیان GPIbα در فراورده 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 GPIbα (MFI) همراه با افزایش بیان سایر مارکرهای فعالیتی پلاکتی همچون P-selectin، CD40L، PS در حین نگهداری پلاکت در انواع فراورده‌های 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 فراورده‌های گفته‌شده، میزان بیان GPIbα 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 GPIbα (MFI) در روزهای اول با نمونه کنترل تولید شده تفاوتی نداشته است که این امر بیانگر کیفیت مطلوب فراورده‌های 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 GPIbα می‌باشد که در مطالعه اخیر نیز بدان اشاره گردیده است.[۲۱و۲۲و۲۴]

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

مطالعاتی که اولین‌بار 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 ٤٥٪ 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 کاهشی 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 فراورده‌های 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، GPIbα، است که از روز اول تا روز سوم و پنجم به‌طور مداوم کاهش می‌یابد.[۲۱-۲۳و۲۷] به‌نظر می‌رسد در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

خصوص گیرنده GPVI، میزان افزایش بیان در روزهای اول نگهداری به شکلی جبران‌کننده فرایند ریزش گیرنده بیان‌شده است که برایند آن‌ها کماکان می‌تواند توأم با عدم کاهش و یا حتی افزایشی جزیی در بیان گیرنده باشد. از طرفی این احتمال نیز وجود دارد که میزان ریزش گیرنده GPVI در روزهای اول کمتر از GPIbα باشد به طوری که نمی‌تواند منجر به کاهش بیان گیرنده یاد شده در سطحی که در گیرنده GPIbα مشاهده گردید، شود.

به‌طور کلی پژوهش کنونی ارزیابی جامعی را از تغییرات فنوتیپی و بیان گیرنده‌های GPIbα و GPVI در پلاکت‌های تولیدی سازمان انتقال خون حین ذخیره‌سازی ارایه نموده است که نشان‌دهنده کاهش بیان معنادار گیرنده‌های گفته‌شده در طی پنج روز نگهداری فرآورده می‌باشد. لازم به یادآوری است، از آنجا که این مطالعه برای اولین‌بار به بررسی شاخص‌های مرتبط با گیرنده GPVI پرداخته، منحصر به فرد بوده و همچنین تکمیل‌کننده سایر مطالعات مرتبط با فرایند آسیب نگهداری پلاکت است. به‌علاوه با توجه به نقش محوری گیرنده GPVI در فرایند چسبندگی پلاکتی و تشکیل لخته به‌ویژه در شرایط Shear پایین، به‌نظر می‌رسد کاهش بیان این گیرنده در فراورده‌ها در طی نگهداری به‌طور قطع اثرات سویی در کارآیی پلاکت‌های مورد استفاده خواهد داشت.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مطالعه سطوح بیان و Shedding مولکول‌های Adhesive و Proinflammatory پلاکتی در فراورده‌های پلاکت راندوم تولیدی سازمان انتقال خون" مصوب مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون در سال ۱۳۹۰ به کد ۱۳۹۰-۰۱-۳۳-۱۴۹۶ می‌باشد که با حمایت آن موسسه اجرا شده است. همچنین همکاری‌های مجدانه پایگاه انتقال خون استان تهران به‌خصوص سرکار خانم فاطمه عباسی نیز شایان تقدیر است. نویسندگان همچنین از زحمات خانم مهندس مریم‌السادات طاهری تشکر می‌نمایند.

References

1. Hosseini E, Ghasemzadeh M. Different Stages of Platelet Adhesion to the Site of Vascular Injury. *IJBC* 2012;4(3):133-42.
2. Ohto H, Nollet KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2011;44(3):321-5.
3. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010;116(12):2011-8.
4. Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009;41(2):105-13.
5. Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, Hua M, Qiao J, White MJ, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopathy that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* 2011;118(6):1663-74.
6. Gardiner EE, Andrews RK. Platelet receptor expression and shedding: glycoprotein Ib-IX-V and glycoprotein VI. *Transfus Med Rev* 2014;28(2):56-60.
7. 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.
8. 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.
9. Ikeda Y, Handa M, Murata M, Goto S. A new approach to antiplatelet therapy: inhibitor of GPIb/V/IX-vWF interaction. *Haemostasis* 2000;30 Suppl 3:44-52.
10. Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 1998;17(1):1-19.
11. 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 GPIb and PAR4. *Nat Commun* 2015;6:7835.
12. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost* 2015;113(6):1224-35.
13. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* 2013;131(3):191-7.
14. 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.
15. 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.
16. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102(2):449-61.
17. 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.
18. 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.
19. 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]
20. 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.
21. 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

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, 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.
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. Metcalfe 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]

TUMJ Tehran University Medical Journal, April 2016; Vol. 74, No. 1: 16-24 Original Article

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.

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 Ibα (GPIbα) of the GPIb-IX-V complex and platelet glycoprotein VI (GPVI). GPIbα 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 GPIbα 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 GPIbα 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 GPIbα 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 GPIbα expression on first day (MFI=86±5.9) was reduced three days after storage (MFI= 69±6.9). The expression levels continued to reduce until day 5 in which GPIbα expression was markedly decreased to (MFI= 61±7.7) (P= 0.0094). GPVI expression on the days 1, 3 and 5 after storage were 20.6±3.3, 24±2.5 and 14±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 GPIbα and GPVI after 5 days storage, suggesting a major defect in adhesive function of platelets during this term.

Keywords: adhesion receptor, GPIbα, platelet activation, platelet membrane glycoprotein VI, 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: e.hosseini10@yahoo.com.au

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-24]