

## کاهش سطوح بیان رسپتور پلاکتی GPIIb/IIIa به واسطه ریزش خارج غشایی در فرآورده‌های پلاکتی تغلیظ شده از پلاسمای غنی از پلاکت

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۱۹ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۴ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۴/۰۵

**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 GPIIb/IIIa و در نهایت آسیب‌های دوران نگهداری پلاکت‌ها گردد. هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان و ریزش رسپتور GPIIb/IIIa در حین نگهداری فرآورده پلاکتی کنسانتره می‌باشد. **روش بررسی:** مطالعه حاضر به صورت تجربی از شهریور ماه سال ۱۳۹۳ تا ابتدای سال ۱۳۹۴ با بررسی فرآورده‌های پلاکتی حاصل از Platelet-rich plasma (PRP) در سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفته است. سطوح بیان GPIIb/IIIa 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 سنجدیده و مقایسه شد. **یافته‌ها:** میزان بیان GPIIb/IIIa در روز اول نگهداری (Mean fluorescence intensity, MFI= ۸۶±۵/۹) بود که تا روز پنجم به شکل معناداری کاهش یافت (P=۰/۰۰۹۴) و به سطح بیان (MFI= ۶۱±۷/۷) رسید. همچنین مقادیر به دست آمده از GPIIb/IIIa محلول (گلیکوکالیسین) در روز اول (۰/۳۱±۰/۰۳)، سوم (۱/۰۶±۰/۰۶) و پنجم (۱/۵±۰/۰۴)، 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 GPIIb/IIIa پلاکت‌ها در طول نگهداری، به نظر می‌رسد که نگهداری فرآورده‌های پلاکتی به خصوص تا روز پنجم کارایی آنها را جهت مصارف بالینی کاهش دهد ضمن اینکه تزریق فرآورده‌های با مقادیر بالای GPIIb/IIIa محلول نیز ممکن است منجر به عوارض پیش التهابی و اختلال جسیبندگی گردد.

**کلمات کلیدی:** فعالیت پلاکتی، گلیکوکالیسین، GPIIb/IIIa، پلاسمای غنی از پلاکت، ترمبوز.

زینب پیر محمد جماعت  
احترام السادات حسینی  
مهران قاسم‌زاده\*

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

\* نویسنده مسئول: بزرگراه شیخ فضل‌الله نوری، تقاطع  
بزرگراه شهید همت، جنب برج میلاد، مرکز تحقیقات  
انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب  
انتقال خون، تهران، ایران.

تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۰۱۵۷۲-۳  
E-mail: mehnan1476@yahoo.com

### مقدمه

کلسیم پایه‌ی داخل سلولی می‌باشد<sup>۱</sup> 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.<sup>۲</sup> در این میان کمپلکس GPIIb-V-IX که متشکل از چهار زیرواحد گلیکوپروتئینی مجزا (GPIIb، GPIIb $\beta$ ، GPV و GPIX) می‌باشد نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. این رسپتور که نقشی اساسی در هموستاز

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 به دنبال انتقال پلاکت می‌باشد.<sup>۱</sup> ابتدای این فرایند همراه با از دست دادن شکل مورفولوژیک دیسکوئیدی پلاکت ناشی از افزایش جزئی در میزان

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 فرآورده پلاکتی) مورد مطالعه قرار گرفت.

نمونه‌های پلاکتی مطابق شرایط استریل آزمایشگاهی با استفاده از دستگاه متصل کننده کیسه‌های خون (Terumo sterile tubing welder) (tsdii) به شکل استریل، به سه قسمت تقریباً 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 فرآورده را توسط محلول کار تایرود  $1 \times 10^9$  mL به رساندیم. فرآورده‌ی PRP به دو قسمت مساوی تقسیم و تحت عنوان بخش ۱ و ۲ نام‌گذاری شد. بخش یک را با دور  $1700 \text{ g}$  به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ کرده و پلاسما رویی فاقد پلاکت (PPP) را جدا نمودیم. پلاکت باقی‌مانده را با استفاده از محلول کار تایرود  $1 \times 10^9$  resuspend کرده و برای فلوسایتومتری به کانت  $3 \times 10^7$  mL رساندیم.<sup>۱۱</sup>

پلاکت‌ها با آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل (FITC Mouse IgG1 Isotype control (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) یا آنتی‌بادی ضد GPIIb/IIIa (FITC Mouse Anti-human CD42b (e-) bioscience, America) به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای  $37^\circ \text{C}$  انکوبه گردیده و در نهایت توسط (Partec Cyflow flow cytometer (FlowJo software, version 7 GmbH, Münster, Germany) و (TreeStar, Ashland, OR, USA) مورد خوانش و آنالیز قرار گرفتند.

به بخش ۲ (فرآورده PRP) یونوفور کلسیم A23187 با غلظت نهایی  $5 \mu\text{mol}$  اضافه گردید که حدود دو ساعت در انکوباتور در دمای  $37^\circ \text{C}$  قرار داده شد (به‌عنوان نمونه کنترل مثبت ریزش) سپس با دور  $1700 \text{ g}$  به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ و پلاسما آن برای مطالعات ریزش جدا شد. سپس پلاسماهای جدا شده از پلاکت بخش ۱ (پلاسما تیمار نشده با یونور کلسیم) و پلاسماهای جدا شده از پلاکت بخش ۲ (پلاسما تیمار شده با یونوفور کلسیم) به ترتیب به مدت ۳۰ با دور  $20000 \text{ g}$  اولتراسانتریفوژ گردید.

در نهایت مایع رویی به‌عنوان نمونه فاقد میکروپارتیکل و حاوی رسپتورهای Shed شده از جمله GPIIb/IIIa می‌باشد که در فریزر  $-20^\circ \text{C}$  جهت بررسی توسط وسترن بلات ذخیره گردید. تمامی مراحل برای

اولیه بازی می‌کند، اتصال پلاکت‌های در حال گردش به محل جراحی عروق سرخرگی را از طریق واکنش GPIIb/IIIa با vWF ساکن روی رشته‌های کلاژنی ماتریکس تحت اندوتلیال، با وجود شدت جریان بالای خون موجود در شریان‌ها تامین می‌نماید.<sup>۹</sup> همچنین GPIIb/IIIa یک عامل تنظیم‌کننده بسیار قوی در بقای پلاکت‌ها<sup>۱۰</sup> 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.<sup>۷،۸</sup>

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

دومین خارج سلولی GPIIb/IIIa که متعاقب ریزش به صورت محلول در محیط پراکنده می‌شود، گلیکوکاليسین نام دارد که میزان فزاینده‌ی آن در حین ذخیره‌ی پلاکت‌ها گزارش شده است.<sup>۱۱</sup> با توجه به اهمیت ریزش رسپتور GPIIb/IIIa در فرایندهای مرتبط با بقا و کلیرانس پلاکت، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی میزان و الگوی بیان 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 ۱۳۹۴ به انجام رسیده است. نمونه‌گیری در جمعیت نرمال و به صورت تصادفی انجام شده است. در این مطالعه در مجموع پنج کیسه

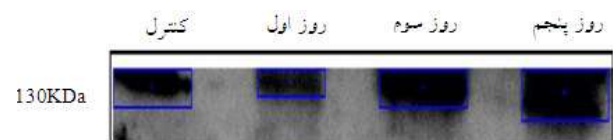
میزان بیان رسپتور در نمونه در حال استراحت می‌باشد. در نمودار هیستوگرام، محور افقی بیانگر FL1 (فلورسنت مربوط به FITC) و محور عمودی بیانگر تعداد پلاکت‌ها است.

در بررسی MFI بیان GPIba در روز اول با بیان  $(86 \pm 5/9)$ ، به صورت  $(Mean \pm SD)$  نشان داده شد که در روز سوم به علت از دست دادن رسپتور GPIba (ریزش و یا میکروپارتیکلیشن) کاهش پیدا کرد  $(69 \pm 7/9)$ . در روز پنجم نیز نسبت به روز سوم این کاهش ادامه یافت  $(61 \pm 7/7)$  که البته این تفاوت‌ها معنادار نبودند، ولیکن به‌طور کلی از روز یک تا پنج با کاهش معناداری با  $(P=0/0094)$  روبرو بودیم (نمودار ۱).

میانگین میزان بیان GPIba در روز تهیه نمونه کنترل، بر حسب  $(Mean \pm SD)$ ،  $91 \pm 8/3$  بود. مطالعات آماری نشان داد که با استفاده از داده‌های MFI در روز اول تفاوت معناداری از نظر بیان GPIba 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  $20^{\circ}C$  خارج گردیده، پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها با سمپل بافر (به نسبت یک دوم) در دمای  $90^{\circ}C$  حرارت داده شد. در شکل ۴، غشای PVDF حاوی باندهای گلیکوکالیسین ( $130KDa$ ) 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 منظور کشیدن نمودار، از نسبت Volume adjust intensity نمونه‌ها به Volume adjust intensity کنترل یونفور استفاده گردید. مقادیر به‌دست آمده برای روز اول



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

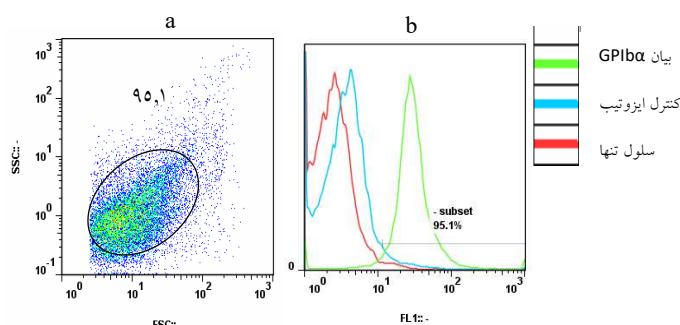
نمونه‌های روز اول، سوم و پنجم انجام شد و آنالیز داده‌های فلوسیتومتری از طریق Mean fluorescence intensity (MFI) جهت مطالعه GPIba انجام پذیرفت.

آزمایش‌های وسترن بلات مطابق روشی که پیش‌تر توصیف گردیده است<sup>۱۱</sup> انجام پذیرفت که در نهایت با استفاده از ChemiDoc TM XRS system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفت.

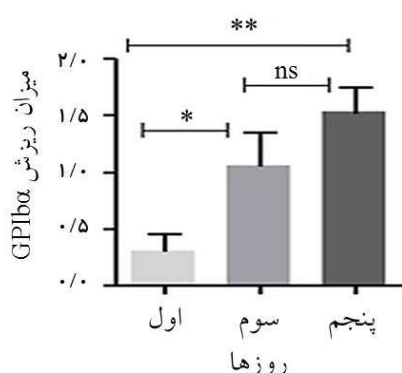
برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism, version 6.07 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) استفاده گردید. برای مقادیر خام هر گروه میانگین و انحراف معیار محاسبه شد و برای مشخص کردن منشأ تفاوت احتمالی بین سه نمونه (روز یک، سه و پنج) از متد آماری Kruskal-Wallis test همراه با Dunn's multiple comparison test استفاده شد. در این مطالعه حصول مقادیر  $P < 0/05$  به‌عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

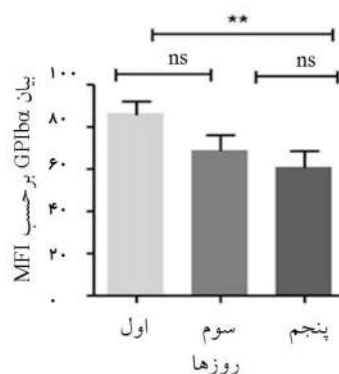
به دنبال انکوباسیون پلاکت‌ها با آنتی‌بادی منوکلونال ضد رسپتور GPIba (کونژوگه شده با FITC)، توسط تکنیک فلوسایتومتری تشخیص جمعیت پلاکتی (شکل ۱) انجام شد. در شکل ۱، نمودارهای (a) Scatter gram و (b) Histogram نشان داده شده است که میزان انحراف نمودار بیان GPIba از نمودار ایزوتایپ کنترل نشانه



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



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



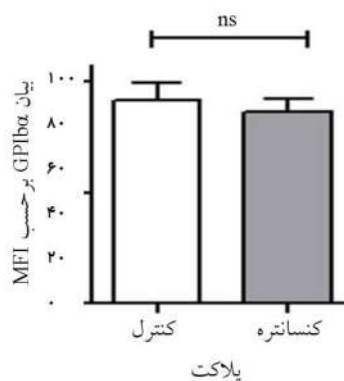
نمودار ۱: نمودار تغییرات بیان GPIb $\alpha$  پلاکت‌ها طی روزهای نگهداری بر اساس MFI. ns: یعنی معنادار نمی‌باشد، \*\* یعنی اختلاف معنادار می‌باشد با ( $P < 0.01$ ).

## 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 آفریزس طی هشت روز نگهداری فرآورده است که بیانگر کاهش میزان رسپتور سطحی GPIb $\alpha$  و افزایش چشمگیر میزان P-selectin می‌باشد.<sup>۱۲</sup> مطالعات Sandgren و Albanyan و Ostrowski نیز حاکی از کاهش میزان بیان GPIb $\alpha$  (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.<sup>۱۳</sup> و ۱۴

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 GPIb $\alpha$  متناسب با طول دوره نگهداری کاهش یافته است. ما همچنین نشان دادیم که میزان بیان رسپتور GPIb $\alpha$  (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 بررسی آسیب دوران نگهداری پلاکت‌ها مد نظر قرار داده‌اند.



نمودار ۲: مقایسه میزان بیان GPIb $\alpha$  نمونه کنترل پلاکتی با فرآورده‌های پلاکتی کنسانتره روز اول. ns: یعنی معنادار نمی‌باشد.

( $0.31 \pm 0.03$ )، سوم ( $1.06 \pm 0.06$ ) و پنجم ( $1.50 \pm 0.04$ ) به‌صورت (Mean $\pm$ 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 ( $P = 0.0098$ ) معنادار می‌باشد (نمودار ۳).

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 GPIIb/IIIa در کاهش ریکاوری پلاکت‌ها به واسطه کلیرانس زود هنگام آنها توسط گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئینی ماکروفاژهای سیستم اندوتلیال دارند. مطالعه حاضر حاکی از کاهش معنادار سطوح بیان رسپتور عملکردی GPIIb/IIIa پلاکت‌ها در طول نگهداری به‌خصوص در فرآورده‌های پلاکتی روز پنجم بوده است. با توجه به اینکه این مشاهدات همراه با افزایش ریزش خارج غشایی (Shedding) این رسپتور در طول نگهداری فرآورده بوده است به‌نظر می‌رسد مکانیسم مذکور به‌عنوان دلیل اصلی کاهش رسپتور GPIIb/IIIa در شرایط نگهداری فرآورده محسوب گردد.

سپاسگزاری: این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۴۹۶-۳۳-۰۱-۱۳۹۰ 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.

در مطالعه‌ای که توسط Kosteljik 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.<sup>۱۶</sup> 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.<sup>۱۷</sup> این مطالعه تکمیل‌کننده مطالعه پیشین Kunishima و همکاران می‌باشد که افزایش میزان GC (گلیکوکالیسین) را نشان داده بودند.<sup>۱۸</sup>

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 GPIIb/IIIa همراه با افزایش فرایندهای مقادیر GC در روز پنجم نگهداری در

## References

- 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* 1998;38(1):31-40.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010;116(12):2011-8.
- 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.
- Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009;41(2):105-13.
- Quinn M, Fitzgerald D, eds. *Platelet Function Assessment, Diagnosis, and Treatment*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 4, 44-9, 115-26, 35-36.
- 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.
- Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost* 2015;113(6):1224-35.
- Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* 2013;131(3):191-7.
- 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.
- Bergmeier W, Piffath CL, Cheng G, Dole VS, Zhang Y, von Andrian UH, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/IIIa shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res* 2004;95(7):677-83.
- 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.
- 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.
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, Bochsén L, Salado-Jimena JA, Ullum H, Reynaerts I, Goodrich RP, et al. In vitro cell quality of buffy coat platelets in additive solution treated with pathogen reduction technology. *Transfusion* 2010;50(10):2210-9.
  16. Kosteljik E, Folman C, Gouwerok C, Kramer C, Verhoeven A, De Korte D. Increase in glycofibrin 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 glycofibrin in platelet concentrate supernatants stored in a synthetic medium (Seto solution). *Vox Sang* 1998;75(1):74-5.

## The expression loss of GPIb $\alpha$ 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.

\* 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

### 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, GPIb $\alpha$  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 GPIb $\alpha$ . This study investigates the levels of expression and ectodomain shedding of platelet adhesive receptor GPIb $\alpha$  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 GPIb $\alpha$  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 GPIb $\alpha$  expression during storage where the expression from first day (Mean fluorescence intensity=86 $\pm$ 5.9) was significantly reduced compared to that of fifth day (mean fluorescence intensity=61 $\pm$ 7.7) after storage (P=0.0094). Conversely, shed GPIb $\alpha$  (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 $\pm$ 0.3 to 1.5 $\pm$ 0.4 by the day 5 after storage.

**Conclusion:** Our study has demonstrated significant loss of platelet GPIb $\alpha$  during storage mostly due to receptor ectodomain shedding that leads to significant increase of soluble GPIb $\alpha$  in stored platelets. Considering the high levels of shed GPIb $\alpha$  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, GPIb $\alpha$ , platelet activation, platelet-rich plasma, thrombosis.