

خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۱۴ شماره ۴ زمستان ۹۶ (۳۲۵-۳۳۴)

مقاله پژوهشی

تأثیر حساسیت‌زدایی پلاکت‌ها بر مقادیر باقیمانده تحریک‌پذیری در II پلاکت‌های افراد مبتلا به دیابت ملیتوس نوع II

راضیه محمودیان^۱، مرتضی سلیمانی^۲، محسن حمیدپور^۳، احمد قره‌باغیان^۴

چکیده سابقه و هدف

آترواسکلروزیس، از مهم‌ترین وقایع ترومبوتیک در دیابت ملیتوس نوع II است. هیبرگلیسمی مزمون یک فاکتور اصلی برای فعال شدن پلاکت‌ها در این بیماران می‌باشد. پدیده حساسیت‌زدایی در پلاکت‌ها، پروسه‌ای فیزیولوژیک است که نقش مهمی در خاموش کردن مسیرهای انتقال سیگنال در پاسخ به آگونیست دارد. در این پژوهش به بررسی این پدیده در پلاکت‌ها در دیابت پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بنیادی – کاربردی، ۴۰ بیمار دیابت ملیتوس نوع II و ۳۵ نفر از افراد داوطلب سالم به عنوان کنترل، انتخاب شدند. پس از جمع‌آوری نمونه‌های سیتراته و جدا کردن PRP، حساسیت‌زدایی با دوز پایین ADP انجام شد. میزان شمارکر CD62P و میکروپارتیکل‌های CD41⁺-Annexin-V⁺ با استفاده از فلوسیتومتری ارزیابی شد. نتایج داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنوا و t-test تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج نشان داد پلاکت‌های دیابتیک در حالت Baseline نسبت به افراد سالم، CD62P بالاتری بیان می‌کنند. هم چنین در پلاکت‌هایی که حساسیت‌زدایی شدند، میزان بیان CD62P کمتر و میزان تشکیل میکروپارتیکل بیشتری داشتند ($p=0.003$). میزان شمارش میکروپارتیکل‌های پلاکتی در مورد پلاکت‌های دیابتی بالاتر بود ($p=0.004$ ، SD: $\pm 74/52$).

نتیجه‌گیری

پلاکت‌ها در شرایط تیمار خفیف آگونیستی، با وجود بیان CD62P بالا، تحریک‌پذیری پایینی به ADP دارند که ممکن است ناشی از پدیده حساسیت‌زدایی باشد که به پلاکت‌ها در سازگاری با محیط متابولیک خود کمک می‌کند. هم چنین پلاکت‌ها تحت تاثیر این پدیده مستعد تولید میکروپارتیکل‌های پلاکتی بیشتری می‌شوند که می‌توانند در عوارض ترومبوتیک دیابت نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: ADP، پلاکت‌ها، دیابت قندی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۳/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۳

-
- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
۲- PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان - کاشان - ایران
۳- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون - دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی خونساز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران - کد پستی: ۱۹۷۱۶۵۳۳۸۳
۴- PhD ایمنوهماتولوژی بالینی - استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - مرکز تحقیقات بیماری‌های مادرزادی خونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۴۵۶

از درمان طولانی مدت با داروهایی باشد که به عنوان آگونیست رسپتورها عمل می‌کنند(۱۵، ۱۶). آنتی‌ژن سطحی ATP/CD39 دی‌فسفوهیدرولاز سطح عروق سالم، مانع از فعال شدن پلاکت‌ها در شرایط طبیعی می‌شود و بنابراین در شرایط مختلف آسیب عروقی و اختلال در عملکرد عروق مانند بیماری دیابت، عملکرد این پروتئین مهار و سرکوب می‌شود و بنابراین فعال شدن پلاکت‌ها اتفاق می‌افتد(۱۷). ADP بیان دو دسته از رسپتورهای وابسته به G پروتئین‌ها را فعال می‌کند: P2Y1 و P2Y12. در پدیده حساسیت‌زدایی این دو رسپتور در پلاکت‌ها نقش دارند و در اثر تماس طولانی مدت پلاکت‌ها با ADP، مکانیسم حساسیت‌زدایی مکانیسمی پیچیده است و شامل فسفریلاسیون رسپتور، جدا شدن از G پروتئین‌ها، داخل غشایی شدن (ایترنالیزه شدن) آن‌ها توسط مکانیسم‌های وابسته به کیناز و نهایتاً مهار داخل سلولی می‌شود(۱۸). در این مطالعه سعی شده با تیمار خفیف آگونیستی پلاکت‌ها، به بررسی این پدیده در پلاکت‌های بیماران دیابتی پرداخته شود. رفتار پلاکت‌ها در این مطالعه بر اساس بیان مارکر CD62P که مارکر فعل شدن پلاکت است، بررسی می‌شود. از آن جایی که میکروپارتیکل‌های پلاکتی در بروز عوارض دیابت نقش مهم و قابل توجهی دارند، در این مطالعه میزان تشکیل میکروپارتیکل‌های پلاکتی $CD41^+ \text{-Annexin-V}^+$ نیز بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد نظر در این مطالعه بنیادی - کاربردی از ۴۰ نفر از بیماران دیابتی که به آزمایشگاه رفرانس دانشگاه علوم پزشکی کاشان مراجعه داشتند و ۳۵ نفر از افراد سالم داوطلب انتخاب شد. افراد کنترل از بین مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه انتخاب شدند و افراد غیر دیابتی، غیر سیگاری، بدون سابقه مصرف مزمن دارویی و بدون سابقه بیماری‌های ترومبوتیک بودند. شرط ورود به این مطالعه برای بیماران و افراد سالم ناشتا بودن و عدم مصرف داروهای آنتی‌پلاکتی بود که از افراد قبل از نمونه‌گیری سؤال پرسیده شد. هم چنین به منظور رعایت قوانین اخلاق

دیابت، از گروه بیماری‌های متابولیک است که با هایپرگلیسمی شناخته می‌شود و ناشی از اختلال در ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو می‌باشد(۱). نوع II دیابت قندی، عامل بیش از ۸۰٪ موارد دیابت ملتیوس است و در اثر تعامل بین فاکتورهای محیطی و وراثت شکل می‌گیرد(۲). افزایش خطر ابتلاء آترواسکلروزیس از مهم‌ترین وقایع ترومبوتیک در بیماران دیابت ملتیوس نوع II می‌باشد(۳). هایپرگلیسمی به تهایی تعریف دیابت نیست اما به عنوان یک فاکتور مستقل و مهم در ایجاد حالت پروتروموبتویک در بیماران دیابت ملتیوس نوع II نقش دارد(۴، ۵). فاکتورهای متعددی در ایجاد شرایط پروتروموبتویک در این بیماران تاثیر دارند(۶، ۷). تولید میکروپارتیکل‌های پلاکتی در این شرایط بسیار حائز اهمیت است(۸). مکانیسم‌هایی که باعث ایجاد پلاکت‌های هایپراکتیو در این بیماران می‌شوند شامل: ۱- هایپرگلیسمی، ۲- کمبود انسولین و مقاومت به انسولین، ۳- شرایط متابولیک مرتبط با دیابت مانند چاقی، دیس لیپیدمیا و افزایش التهاب سیستمیک(۹). میکروپارتیکل‌های پلاکتی (PMPs)، قطعات ۱/۱۰ میکرونی هستند که از غشای پلاکت‌های فعل شده یا تحت استرس یا پلاکت‌های در حال آپوپتوز با عمل ریزش(shedding) جدا می‌شوند. آن‌ها غشای پلاسمایی فسفولیپیدی دارند و انواع رسپتورهای عملکردی را از پلاکت‌ها به ارت می‌برند(۱۰). هم چنین می‌توانند همانند پلاکت در هموستانز خون، ترومبوز، سرطان و التهاب نقش ایفا کنند(۱۱). مسیر وابسته به TF و میکروپارتیکل‌ها به نظر نقش کلیدی در ترومبوفیلی دیابتی و عوارض قلبی - عروقی دارد(۱۲).

حساسیت‌زدایی در پلاکت‌ها پروسه‌ای پیچیده و حساس است که نقش مهمی در حاموش کردن مسیرهای انتقال سیگنال در پلاکت‌ها ایفا می‌کند و به سلول اجازه می‌دهد با تغییرات محیطی سازگار شود(۱۳). در پلاکت‌های هایپراکتیو، رها شدن مدام و اتوکرین ADP از پلاکت‌های فعل شده، منجر به حساسیت‌زدایی و کاهش حساسیت پلاکت‌ها به آگونیست ADP می‌شود(۱۴). هم چنین ممکن است این پدیده، در اثر عوارض جانبی ناشی

دوز پایین ADP و انکوباسیون یک ساعته و سپس تیمار شده با دوز بالای ADP (Low +High ADP) و انکوباسیون ۱۰ دقیقه بود. لوله چهارم حاوی پلاکت‌هایی بود که تنها در معرض غلظت بالای ADP (High ADP) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته بودند. سنجش فلوسیتومتری برای هر مرحله در دو لوله مجزا یکی برای انکوباسیون با آنتی‌بادی اختصاصی CD62P که با RPI کونژوگه (انگلیس، ABCAM) شده بود و لوله دیگر حاوی آنتی‌بادی اختصاصی CD41 کونژوگه شده با RPI (آلمان، داکو) و آنتی‌بادی اختصاصی FITC Annexin- V کونژوگه شده با (ترویژن، آمریکا) انجام شد. انکوباسیون نمونه‌ها با آنتی‌بادی‌ها به مدت یک ساعت و در دمای محیط با شیکینگ ملایم صورت گرفت. میزان بیان CD62P و مقدار میکروپارتیکل‌های Annexin-V⁺-CD41⁺ در هر لوله سنجش شد. میزان بیان CD62P پس از گیت‌بندی پلاکت‌ها در نمودار FSC در برابر SCC به صورت نمودار هیستوگرام در کanal 2 (آنتی‌بادی علیه CD62P) بررسی شد. در هر ران فلوسیتومتری از ایزووتایپ کترل استفاده شد. به منظور گیت‌بندی میکروپارتیکل‌های پلاکتی، در مرحله اول در نمودار FSC در برابر SCC، میکروپارتیکل‌ها به صورت ذرات کمتر از یک میکرون گیت‌بندی شد و سپس با توجه به کanal 1 (آنتی‌بادی علیه Annexin-V و FL2 (آنتی‌بادی علیه CD41)، میکروپارتیکل‌ها مشخص شدند. میزان بیان CD62P به صورت درصد و میزان شمارش میکروپارتیکل‌های پلاکتی به صورت تعداد در میکرولیتر گزارش شد. داده‌های حاصل از بررسی‌های فلوسیتومتری توسط نرم‌افزار فلوجو (FlowJo 7.6.2, FlowEngine 2.97000, OS version: Windows 7 تحلیل شدند.

آنالیزهای آماری:

به منظور مقایسه نتایج حاصل از فلوسیتومتری در هر دو گروه کترل و تیمار از روش‌های آماری One-way ANOVA و t test استفاده شد. هم چنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 رسم، مقدار p value برای میزان بیان CD62P مساوی ۰/۰۰۳ و میزان شمارش

از تمام شرکت‌کنندگان در پژوهش رضایت نامه کتبی گرفته شد. هم چنین نامه و مجوز کد اخلاق پژوهشی به شماره IR.SBMU.RETECH.REC.1395.257 از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دریافت شد.

جمع‌آوری نمونه‌ها و آماده‌سازی PRP:
نمونه‌ها شامل ۵ میلی‌لیتر از خون کامل در ضد انعقاد سیترات سدیم بود. پس از نمونه‌گیری، PRP توسط سانتریفیوژ با دور آهسته (۰/۲ RCT) و به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد. سپس PRP با پارافرمالدئید (PFA) ۴٪ فیکس شد.

تیمار پلاکت‌ها با دوز پایین و بالای ADP (Stimulation Protocol):

تیمار خفیف آگونیستی با دوز پایین ADP انجام شد. به منظور القای تیمار خفیف آگونیستی در پلاکت‌های موجود در نمونه‌های PRP، PRP با غلظت پایین ۱۰ ADP میکرومولار) و به مدت یک ساعت تیمار شد. تیمار پلاکت‌ها با اضافه کردن پارافرمالدئید (PFA) با غلظت نهایی ۱٪ متوقف گردید. پس از گذشت یک ساعت و تحریک پلاکت‌ها با دوز پایین ADP، پلاکت‌ها در معرض ADP با غلظت بالا (۱۰ میکرومولار) و به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند. این پروسه منجر به حساسیت‌زدایی پلاکت‌ها به ADP گردید که با بررسی‌های فلوسیتومتریک تایید شد. به منظور بررسی اثر هر کدام از غلظت‌های ADP بر پلاکت‌ها و مقایسه پلاکت‌های دو گروه، برای هر نمونه ۴، PRP لوله فلوسیتومتریک درنظر گرفته شد.

بررسی‌های فلوسیتومتریک:

آنالیز نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری مدل (پارتک - آلمان، CyFlow®Space) انجام شد. برای هر نمونه PRP، ۴ لوله در نظر گرفته شد. لوله اول حاوی پلاکت‌های در حال استراحت (Baseline) و بدون اضافه کردن ADP بود. لوله دوم شامل پلاکت‌های تیمار شده تنها با غلظت پایین ADP (Low) به مدت انکوباسیون یک ساعت بود و لوله سوم حاوی پلاکت‌های تیمار شده با ابتدا

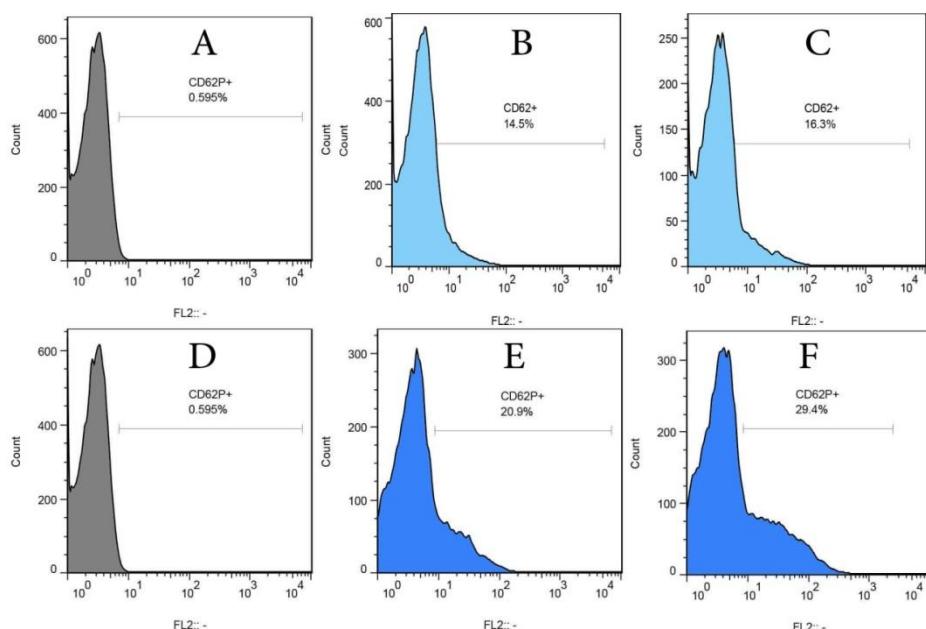
خفیف آگونیستی در هر دو گروه پلاکت‌های دیابتی و کنترل دیده شد اما در مورد پلاکت‌های دیابتی میزان کاهش بیان CD62P بیشتر بود. هم چنین میزان حساسیت و تحریک‌پذیری پلاکت‌ها نسبت به ADP محاسبه و به صورت افزایش یافته (Fold) گزارش گردید. این میزان حساسیت به ADP از طریق تقسیم میزان بیان CD62P در هر مرحله به میزان بیان CD62P در مرحله Baseline محاسبه شد و نمودار رسم گردید (نمودار ۲). حساسیت و تحریک‌پذیری پلاکت‌ها به ADP در نمونه‌های دیابتی کمتر و در نمونه‌های طبیعی بیشتر است. این بدین معنی است که هر چه پلاکت در فاز استراحت باشد، تحریک‌پذیری بیشتری با ADP دارد. از طرف دیگر تیمار خفیف آگونیستی پلاکت‌ها که ممکن است موجب Desensitization پلاکت‌ها گردد، منجر به کاهش تحریک‌پذیری پلاکت‌ها به ADP شد.

پس از بررسی میزان بیان CD62P در هر لوله، شمارش میکروپارتیکل‌های پلاکتی Annexin-V⁺-CD41⁺ نیز جدأگانه در هر لوله انجام گرفت (نمودار ۳ و شکل ۲).

میکروپارتیکل‌های پلاکتی مساوی ۰/۰۰۴٪ محاسبه گردید.

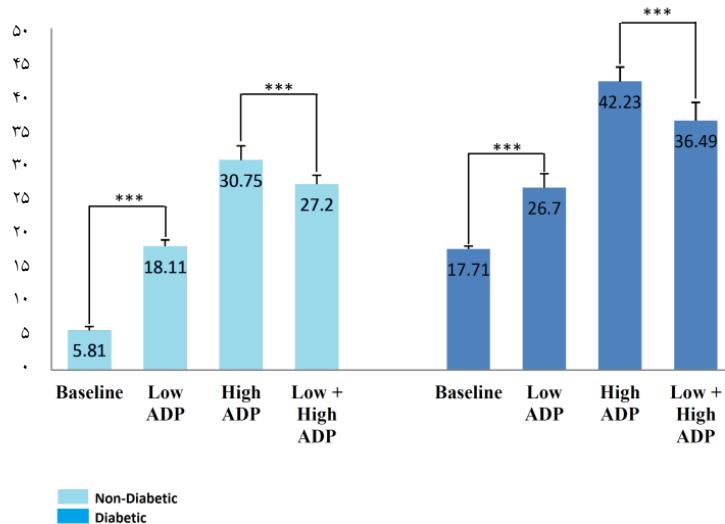
یافته‌ها

بررسی‌های فلوسایتو‌متریک نشان داد پلاکت‌های بیماران دیابتی در مرحله Baseline بیان بالاتری از CD62P را دارا هستند و این پلاکت‌ها حتی بدون حضور آگونیست ADP، سطح بالاتری از CD62P را بیان می‌کنند (شکل ۱). در لوله‌های دوم تا چهارم مربوط به PRP، این افزایش بیان CD62P در بیماران دیابتی نسبت به افراد سالم دیده شد که به علت پره اکتیو بودن پلاکت‌ها در مرحله Baseline این تفاوت وجود داشت (نمودار ۱). هم چنین از مقایسه لوله‌های High Dose با لوله‌های Low Dose می‌توان نتیجه گرفت تیمار خفیف آگونیستی منجر به کاهش Reactivity Induction CD62P و کاهش Reactivity پلاکت‌ها می‌شود که این کاهش بیان CD62P ممکن است ناشی از پدیده Desensitization باشد که در اثر تیمار خفیف آگونیستی اتفاق افتاده است (نمودار ۱). این پدیده نقش مهمی در خاموش کردن مسیرهای انتقال سیگنال در پلاکت‌ها ایفا می‌کند. این کاهش تحریک‌پذیری پلاکت‌ها در برابر تیمار



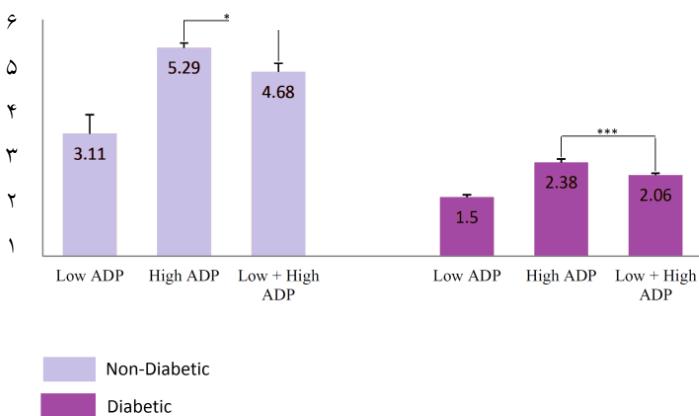
شکل ۱: میزان بیان CD62P در نمودارهای هیستوگرام در مراحل مختلف تیمار آگونیستی در نمونه PRP افراد سالم و دیابتی. نمودار A و D مربوط به ایزوتاپ کنترل هستند. نمودار B در نمونه کنترل و نمودار C مربوط به مرحله High ADP در نمونه Low+High ADP است. نمودار E مربوط به مرحله Low+High ADP در نمونه دیابتی و نمودار F مربوط به مرحله High ADP در نمونه دیابتیک.

درصد بیان CD62P



نمودار ۱: میزان بروز CD62P در مرحله Baseline و سایر مراحل تیمار آگونیستی نشان دهنده وجود تغییرات معنادار در مقایسه با گروه غیر دیابتی است. $p = 0.004***$

حساسیت به (Fold) ADP



نمودار ۲: میزان حساسیت پلاکت‌های دیابتی و طبیعی به آگونیست ADP در لوله‌های مختلف نشان دهنده وجود تغییرات معنادار در مقایسه با گروه غیر دیابتی است. $p = 0.003***$

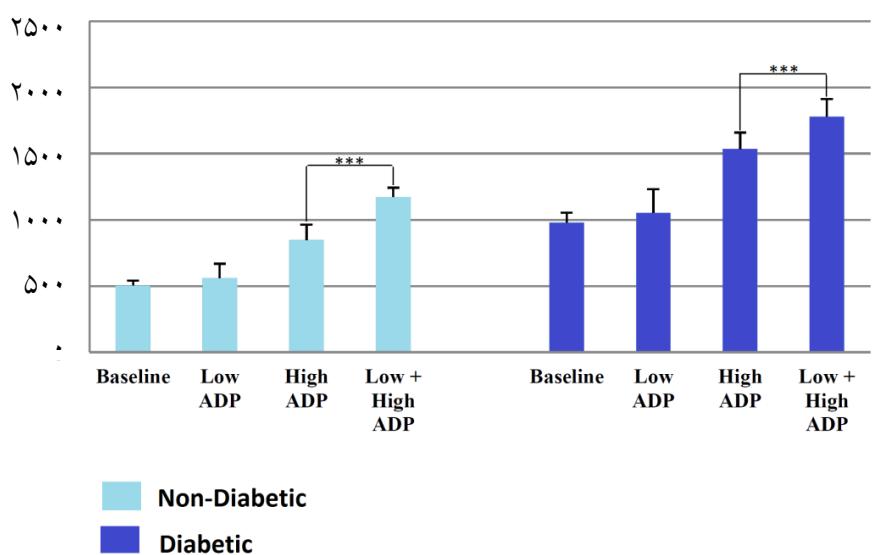
پلاکت‌ها در طول فرآیند نمونه‌گیری و مراحل آماده‌سازی است. اما یافته قابل توجه در مورد میکروپارتیکل‌ها این بود که بیشترین میزان تشکیل میکروپارتیکل‌های پلاکتی در لوله High + Low ADP بود و نه High ADP. برخلاف انتظار، پلاکت‌هایی که با دوز پایین ADP، تیمار

میزان شمارش میکروپارتیکل‌های پلاکتی در هر چهار لوله در مورد پلاکت‌های دیابتی بالاتر بود و تشکیل میکروپارتیکل‌ها در این بیماران نسبت به افراد سالم افزایش بیشتری نشان داد. در نمونه پلاکت‌های Baseline نیز، میکروپارتیکل‌ها تشکیل شدند که ناشی از فعل اشدن

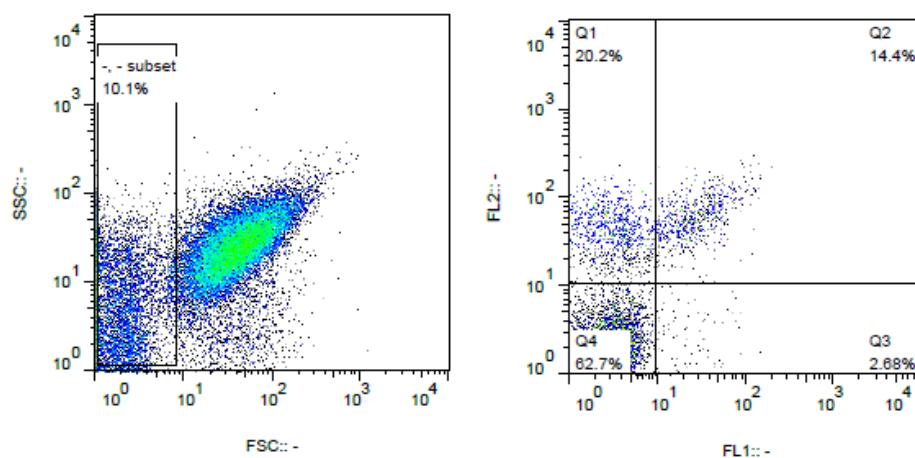
در معرض تیمار خفیف آگونیستی قرار گرفته بودند و سپس با دوز بالای ADP تیمار شدند، علی‌رغم این که پایین تری CD62P Induction داشتند اما مستعد تولید میکروپارتیکل‌های پلاکتی بیشتری بودند.

شدند و پس از آن در معرض دوز بالای ADP قرار گرفتند، میزان تشکیل میکروپارتیکل بیشتری نسبت به پلاکت‌هایی داشتند که در معرض فقط تیمار با غلظت بالای ADP قرار گرفتند. بنابراین پلاکت‌هایی که در ابتدا

شمارش میکروپارتیکل‌ها mL



نمودار ۳: میزان شمارش میکروپارتیکل‌های پلاکتی در مراحل مختلف تیمار آگونیستی نشان‌دهنده وجود تغییرات معنادار در مقایسه با گروه غیر دیابتی است.
*** p= ۰/۰۰۴



شکل ۲: مراحل گیتبندی میکروپارتیکل‌های پلاکتی. در مرحله اول در نمودار FSC در برابر SCC، میکروپارتیکل‌ها به صورت Event های کمتر از یک میکرون گیتبندی می‌شوند (سمت چپ). سپس با توجه با کانال FL1 (آنتی‌بادی علیه V) و FL2 (آنتی‌بادی علیه CD41) میکروپارتیکل‌ها مشخص می‌شوند.

بحث

عروق دیابتی در تحریک مداوم با ADP اتفاق افتاده و منجر به کاهش پاسخ پلاکت‌ها به ADP می‌شود. این در حالی است که در تمام مراحل تیمار آگونیستی، میزان حساسیت و تحریک‌پذیری پلاکت‌های افراد غیر دیابتیک به ADP بیشتر است و میزان CD62P بالاتری را بیان می‌کنند. هم چنین تیمار خفیف آگونیستی در پلاکت‌ها (در هر دو گروه) منجر به کاهش تحریک‌پذیری پلاکت‌ها به ADP می‌شود. در مورد میکروپارتیکل‌های پلاکتی یافته‌ها نشان می‌دهد چنانچه پلاکت‌هایی که در معرض تیمار خفیف آگونیستی در شرایط عروقی دیابتیک Desensitized شدند، اگر در معرض دوز بالای ADP مثلاً تشکیل یک لخته Trombocyte کر قرار بگیرند میزان میکروپارتیکل بیشتری تولید می‌کنند. تولید زیاد و سیستماتیک میکروپارتیکل‌های پلاکتی، یک میدیاتور پیش التهابی و فاکتور پاتولوژیکی محسوب می‌شود (۲۶). هایپرگلیسمی مزمن و پلاکت‌های هایپرآکتیو با بیان بالای CD62P در بیماران دیابتی، فرد را مستعد آترواسکلروزیس می‌کند و امروزه آترواسکلروزیس، یکی از عوارض مطرح و مهم در این بیماران است. امروزه شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد نقش پلاکت‌ها در آترواسکلروزیس با واسطه تولید میکروپارتیکل‌های پلاکتی میانجی گری می‌شود و این میکروپارتیکل‌ها می‌توانند به عنوان یک مارکر پیش آگهی دهنده در بیماری‌های عروقی آترواسکلروتیک مانند دیابت به کار روند (۲۷، ۲۸). هم چنین پاسخ پلاکت‌ها در این بیماران به مواد آنتی‌اگریگاسیون طبیعی در بدن مثل PGI2 و NO کاهش می‌یابد. تمام موارد در پاتوژن آترواسکلروزیس در این بیماری نقش دارد. بر اساس داده‌های حاصل از این پژوهش، در این بیماران پاسخ پلاکت‌ها و تحریک‌پذیری آن‌ها نسبت به ADP نیز کاهش نشان می‌دهد و این کاهش حساسیت به ADP ممکن است در کنار کاهش پاسخ به PGI2 و NO، به نفع و قوع آترواسکلروزیس در این بیماران باشد (۲۹). تولید لوکال میکروپارتیکل‌های پلاکتی به دلیل ویژگی‌های ساختاری و اندازه، آن‌ها را به عنوان ابزاری قدرتمند در ارتباطات سلولی-پلاکتی، در انتقال مولکول‌های بیوакتیو با منشاء پلاکت مانند فاکتورهای رشد و سایر مولکول‌های سیگنالینگ و miRNA ها تبدیل کرده

با توجه به داده‌های حاصل از فلوسایتومتری می‌توان گفت پلاکت‌ها در مرحله Baseline و بدون تیمار با آگونیست در بیماران دیابتی، میزان CD62P بالاتری را بیان می‌کنند و از همان ابتدا پره اکتیو هستند که این وضعیت پلاکت‌ها به محیط متابولیک موجود در بیماران دیابتی مربوط است. پلاکت‌ها به تغییرات محیطی بسیار حساسند و پاسخ می‌دهند. میزان غلظت گلوکز درون پلاکت‌ها بیانگر مقدار غلظت گلوکز خارج سلولی است، چرا که گلوکز برای ورود به پلاکت وابسته به انسولین نیست (۱۹-۲۱). هایپرگلیسمی مزمن و طولانی مدت امروزه به صورت مشخص یک فاکتور اصلی برای فعل شدن پلاکت‌ها و ایجاد پلاکت‌های هایپرآکتیو در بیماران دیابتی شناخته شده است (۲۲-۲۴). تیمار پلاکت‌ها با مقداری خفیف آگونیست ADP در این مطالعه، منجر به کاهش القای بیان CD62P و کاهش Reactivity در پلاکت‌های دیابتی و کنترل می‌شود و ممکن است ناشی از پدیده Desensitization باشد. میزان بیان CD62P در لوله‌ای که تحت تیمار خفیف آگونیستی و سپس دوز بالای ADP قرار می‌گیرد نسبت به لوله تیمار شده، تنها با غلظت بالای ADP کمتر است و می‌توان نتیجه گرفت پلاکت‌ها تحت اثر پدیده Desensitization چهار کاهش پاسخ به آگونیست می‌شوند و این پدیده می‌تواند به پلاکت‌هایی که در محیط متابولیک دیابت، دائماً در معرض آگونیست قرار می‌گیرند کمک کند (۲۵). این پدیده در پلاکت‌های دیابتیک بیشتر است و منجر به کاهش بیشتر بیان CD62P می‌شود. پلاکت‌ها در محیط متابولیک دیابت دائماً در معرض ADP تولید شده توسط پلاکت‌هایی هستند که در این محیط و تحت هایپرگلیسمی فعل شده‌اند. بنابراین بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت این پدیده در کاهش فعل شدن پلاکت‌ها در پاسخ به ADP مؤثر است. پلاکت‌ها در بیماران دیابتیک پره اکتیو هستند و تحریک‌پذیری کمتری هم نسبت به ADP چه در دوز پایین و چه در دوز بالا نشان می‌دهند. این کاهش حساسیت و تحریک‌پذیری پلاکت‌های دیابتیک ممکن است به این علت باشد که Desensitization پلاکت‌های دیابتی در

باعث کاهش Reactivity پلاکت‌ها می‌شود، ممکن است خود عاملی باشد که به این دیر بهبود یافتن زخم‌های دیابتی کمک کند (۳۱، ۳۲).

نتیجه‌گیری

پلاکت‌ها در شرایط تیمار خفیف آگونیستی، با وجود بیان CD62P بالا، میزان تحریک‌پذیری پایینی به آگونیست ADP دارند که ممکن است ناشی از پدیده Desensitization باشد که به پلاکت‌ها در سازگاری با محیط متابولیک خود کمک می‌کند. بنابراین این کاهش Reactivity پلاکت‌ها نسبت به ADP میتواند در کنار کاهش حساسیت به PG-I2 و NO در افزایش برآزو آترواسکلروزیس در بیماران دیابت نقش داشته باشد. از طرف دیگر پلاکت‌ها تحت تاثیر این پدیده مستعد تولید میکروپارتیکل‌های پلاکتی بیشتری می‌شوند که می‌توانند در عوارض ترومبوتیک دیابت نقش داشته باشد. هم چنین کاهش Reactivity پلاکت‌ها نسبت به ADP در بیماران دیابتیک ممکن است خود عاملی باشد که به دیر بهبود یافتن زخم‌های دیابتی کمک کند.

است. این در حالی است که در تولید سیستمیک و فراوان آن‌ها در موقعیت‌های پاتولوژیکی مختلف به عنوان یک مدیاتور پیش‌التهابی و فاکتور پاتولوژیکی عمل می‌کنند و باعث پیشبرد آترواسکلروزیس و عوارض ترومبوتیک می‌شوند (۳۰). بنابراین بر اساس داده‌های این پژوهش پلاکت‌هایی که دچار کاهش Reactivity می‌شوند، در عرض میکروپارتیکل‌های بیشتری تولید می‌کنند و این میکروپارتیکل‌ها در تولید سیستمیک، عوارض ترومبوتیک را به همراه می‌آورند و این پدیده ممکن است در عوارض دیابت نقش داشته باشد. زخم‌های دیابتی یکی از شایع‌ترین و جدی‌ترین عوارض دیابت محسوب می‌شود. بهبود زخم یک پروسه دینامیک و بیولوژیک پیچیده است که شامل فاز هموستاز، التهاب، پرولیفراتیو و ری مادلینگ می‌شود. این پروسه‌ها شامل انواع سلول‌ها، ترکیبات خارج سلولار، فاکتورهای رشد و سایتوکین‌ها می‌شود که تمام این موارد در بیماری دیابت ملیتوس نوع II تحت تاثیر قرار می‌گیرد و منجر به تاخیر در بهبود زخم‌ها در دیابت می‌شود. تیمار خفیف پلاکت‌ها و ایجاد Desensitization از آن جایی که

References:

- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33(Suppl 1): S62-S69.
- Tripathy D, Carlsson M, Almgren P, Isomaa B, Taskinen MR, Tuomi T, et al. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: Lessons from the Botnia study. *Diabetes* 2000; 49(6): 975-80.
- Ferreiro JL, Gómez-Hospital JA, Angiolillo DJ. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 2010; 7(4): 251-9.
- Schneider DJ. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(4): 525-7.
- Lemkes BA, Hermanides J, Devries JH, Holleman F, Meijers JC, Hoekstra JB. Hyperglycaemia: a prothrombotic factor? *J Thromb Haemost* 2010; 8(8): 1663-9.
- Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108(12): 1527-32.
- Osende JI, Badimon JJ, Fuster V, Herson P, Rabito P, Vidhun R, et al. Blood thrombogenicity in type 2 diabetes mellitus patients is associated with glycemic control. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(5): 1307-12.
- Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2010; 8(11): 2358-68.
- Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and anti-platelet therapy in acute coronary syndrome. *Circulation* 2011; 123(7): 798-813.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(1): 15-26.
- Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(6): 356-64.
- Morel O, Jesel L, Abbas M, Morel N. Prothrombotic Changes in Diabetes Mellitus. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(5): 477-88.
- Baurand A, Eckly A, Bari N, Léon C, Hechler B, Cazenave JP, et al. Desensitization of the Platelet Aggregation Response to ADP: Differential Down-regulation of the P2Y1 and P2cyc Receptors. *Thromb Haemost* 2000; 84(3): 489-91.

- 14- Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand WH, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* 2004; 103(4): 1333-41.
- 15- Büinemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 169-92.
- 16- Holme S, Holmsen H. ADP-induced refractory state of platelets *in vitro*. I. Methodological studies on aggregation in platelet rich plasma. *Scand J Haematol* 1975; 15(2): 96-103.
- 17- Zimmermann H. Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. *Nat Med* 1999; 5(9): 987-8.
- 18- Mundell SJ, Barton JF, Mayo-Martin MB, Hardy AR, Poole AW. Rapid resensitization of purinergic receptor function in human platelets. *J Thromb Haemost* 2008; 6(8): 1393-404.
- 19- Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(8): 1476-85.
- 20- Ni H. The platelet "sugar high" in diabetes. *Blood* 2012; 119(25): 5949-51.
- 21- Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost* 2004; 2(8): 1282-91.
- 22- Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. *In vivo* formation of 8-isoprostaglandin F2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999; 99(2): 224-9.
- 23- Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S. Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clin Exp Immunol* 2000; 121(3): 437-43.
- 24- Yngen M. Platelet function in diabetes mellitus Relationships to hyperglycaemia, antidiabetic treatment and microangiopathy. Solna: Karolinska University Press; 2005; p. 91.
- 25- Kakouras N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet Function in Patients with Diabetes Mellitus: From a Theoretical to a Practical Perspective. *Int J Endocrinol* 2011; 2011: 742719.
- 26- Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2011; 32(11): 659-65.
- 27- Tan KT, Lip GY. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2005; 94(3): 488-92.
- 28- Vajen T, Benedikter BJ, Heinzmann ACA, Vasina EM, Henskens Y, Parsons M, et al. Platelet extracellular vesicles induce a pro-inflammatory smooth muscle cell phenotype. *J Extracell Vesicles* 2017; 6(1): 1322454.
- 29- Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(8): 1476-85.
- 30- Alexandru N, Badila E, Weiss E, Cochior D, Stępień E, Georgescu A. Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated microRNAs as active players. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 472(1): 1-10.
- 31- Pierce GF. Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. *Am J Pathol* 2001; 159(2): 399-403.
- 32- Icli B, Nabzdyk CS, Lujan-Hernandez J, Cahill M, Auster ME, Wara AK, et al. Regulation of impaired angiogenesis in diabetic dermal wound healing by microRNA-26a. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 91: 151-9.

Original Article

The effect of Platelets desensitization on the levels of residual platelets reactivity in the diabetes mellitus type 2 patients

Mahmoodian R.¹, Salimian M.², Hamidpour M.^{1,3}, Gharehboghian A.^{1,4}

¹School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Faculty of Paramedicine, Kashan University of Medical Sciences and Health Services, Kashan, Iran

³Hemopoietic Stem cell Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Patients with diabetes mellitus type 2 have accelerated atherosclerosis. Hyperactive platelets and platelets micro particles play an important role in this prothrombotic state. Desensitization is a physiological process which plays an important role in turning off receptor mediated signal transduction pathways. In this study, we described and compared this process in diabetes mellitus type 2 patients and healthy individuals.

Materials and Methods

In this fundamental-applied study, 40 diabetes mellitus type 2 patients and 35 healthy individuals participated in the study. After centrifuging at 200 g, PRP was prepared. Desensitization was induced with mild agonist stimulation and low dose of ADP (1 μ M). Expression of platelets CD62P and CD41+ Annexin-v+ micro particles were evaluated by Flow cytometry. Data were analyzed by Anova and t-test.

Results

In comparison with healthy individuals, the diabetic group showed a significant increase in expression of CD62P in baseline. Desensitized platelets had less expression of CD62Pb but these platelets produced more micro particles in this state. Diabetic group showed a significant increase in production of platelet micro particles in all of states with ADP treatment. ($p \leq 0.004$)

Conclusions

The flow cytometric data show that platelets in patients with diabetes mellitus type 2 patients are hyperactive that it associated to metabolic conditions. Induction of desensitization state helps platelets to reduce platelets activation and platelets sensitivity to ADP in diabetic environment. Also the production of platelets microparticles is high in these patients and desensitized platelets are more susceptible to microparticle shedding.

Key words: ADP, Platelets, Diabetes Mellitus

Received: 21 Jun 2017

Accepted: 4 Jul 2017

Correspondence: Hamidpour M., PhD of Hematology & Blood Banking. Associate Professor of Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.

Postal Code: 1971653383, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22717504; Fax: (+9821) 22717504

E-mail: mohsenhp@sbmu.ac.ir