خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۸ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۰ (۱۷۰-۱۶۱)

مقاله پژوهشی

تأثیر CD40L محلول به دست آمده از کنسانتره پلاکتی بر بقا و فعال‌سازی سلول‌های Daudi

آتوسا نعمتی[۱]، فاطمه یاری[۲]، مهشید محمدی‌پور[۳]، نگار رضایی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

مطالعه‌های پیشین به ارتباط مهم CD40L با لنفوسیت B اشاره کرده‌اند. CD40L پلاکتی نقش مهمی در فعال‌سازی لنفوسیت B و ایمنی هومورال ایفا می‌کند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر CD40L تخلیص شده از فرآورده پلاکتی بر بقا و فعال‌سازی سلول‌های Daudi به عنوان یک رده سلولی در دسترس برای لنفوسیت‌های B خون محیطی بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، CD40L تخلیص شده از فرآورده پلاکتی در دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ng/mL با رده سلولی Daudi مواجه شد. پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از مواجهه، بقا و تکثیر سلول با استفاده از روش MTT و میزان بیان CD27 با استفاده از فلوسیتومتری مورد مطالعه قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS ۲۶ و آزمون‌های آماری Independent two Sample Test و Mann-Whitney استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان‌دهنده افزایش بقای سلول‌ها در ۴۸ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ ng/mL با p=۰/۰۴ و میانگین ۰/۴۱ ± ۰/۶۱ نسبت به گروه کنترل با میانگین ۰/۱۵ ± ۰/۳۰ معنادار و در غلظت ۵۰۰ ng/mL و میانگین ۰/۳۵ ± ۰/۵۸ غیر معنادار بود. میانگین بیان CD27 در تمامی غلظت‌ها افزایش معناداری نشان نداد.

نتیجه گیری

CD40L محلول در بقای سلول‌های Daudi در غلظت‌های بالاتر تاثیرگذار بوده است و افزایش غیر معنادار بیان CD27 به عنوان یکی از مارکرهای فعال‌سازی لنفوسیت B ، نیاز به فراهم کردن شرایط مناسب‌تر هم‌چون استفاده از سیتوکاین‌ها در محیط کشت سلول را بیان می‌کند.

کلمات کلیدی: پلاکت‌ها، بقا، لنفوسیت‌های B

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و طب انتقال خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- PhD ژنتیک مولکولی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- PhD اپیدمیولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم ـ پژوهشکده علوم بالینی غدد ـ پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

مقدمه

CD40L (CD154)، عضو خانواده بزرگ فاکتور نکروز تومور، یک مولکول محرک است که برای اولین بار در سلول‌های T فعال کشف شد(۱). این مولکول از محل متیونین ۱۱۳ دومین خارج سلولی شکسته و به فرم محلول ترشح می‌شود(۳، ۲). لنفوسیت‌های B ، آنتی‌ژن‌های سطح سلول و آنتی‌ژن‌های محلول داخل سلولی را شناسایی می‌کنند و به پلاسما سل‌های تولیدکننده آنتی‌بادی تمایز می‌یابند. علاوه بر سلول‌های T، پلاکت‌ها نیز با فعال‌شدن، سطوح بالایی از CD40L را بیان می‌کنند(۴). اصلی‌ترین رسپتور آن مولکول CD40 است که توسط سلول‌های ایمنی و غیر ایمنی بیان می‌شود(۷-۵). فعال شدن CD40 سیگنال‌های حیاتی برای فعالیت، تمایز و ترشح ایمنوگلوبولین‌ها از لنفوسیت B را فراهم می‌کند(۸).

طبق مطالعه‌های گذشته، تخمین زده شده است که بیش از ۹۵ درصد از CD40L محلول(sCD40L) در گردش خون، مشتق از پلاکت‌هاست(۱۰، ۹). این مولکول نقشی محوری در تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی از طریق میان‌کنش CD40L-CD40 دارد(۱۲، ۱۱). راتلیف و همکارانش نشان دادند که در پاسخ ایمنی اولیه، زمانی که تعداد لنفوسیت‌های $CD4^+$ T کم است، CD40L محلول حاصل از پلاکت‌ها، سیگنال‌های اولیه برای تکثیر لنفوسیت‌های B را فراهم می‌کند(۱۳).

رده سلولی Daudi یک رده سلولی لنفوبلاستوئید B مشتق از لنفوم بورکیت است(۱۴). تفاوت عمده بین لنفوسیت‌های اولیه B و سلول‌های Daudi ، عدم وجود کلاس HLA I در سطح این سلول‌ها است(۱۵). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که یکی از مارکرهای فعال‌سازی لنفوسیت B، CD27 می‌باشد(۱۶). بدین منظور جهت بررسی فعال‌سازی سلول Daudi ، از بررسی بیان این مارکر استفاده شد. با توجه به میزان فراوان CD40L در کنسانتره پلاکتی(PC) و نقش مطرح شده این مولکول در بقا و تکثیر لنفوسیت B، ما را بر آن داشت تا به تاثیر فرم محلول CD40L به صورت خالص شده با استفاده از سلول Daudi (رده سلولی مشتق از لنفوسیت B) بپردازیم تا نقش آن بر بقا و فعال‌سازی لنفوسیت‌های B بیش‌تر مشخص شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

تخلیص پروتئین به وسیله کروماتوگرافی تمایلی:

۵ میلی‌لیتر از محلول رویی فرآورده پلاکتی(پلاسمای فاقد میکروپارتیکل‌های پلاکتی)، با ۵ میلی‌لیتر از PBS رقیق شد و سپس شیر ستون بسته شد و نمونه به آرامی وارد ستون گردید.

به منظور خروج پروتئین‌های متصل نشده یا پروتئین‌های متصل غیراختصاصی و یا سست، ستون چندین مرتبه با بافر PBS شست‌وشو داده شد. با استفاده از بافر گلیسین ۰/۱ مولار(pH برابر با ۲/۸) شستشو صورت گرفت و محلول خروجی جمع‌آوری گردید. از قبل در لوله‌های جمع‌آوری نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر از بافر تریس ۲ مولار(pH برابر با ۸) اضافه شد تا pH بافر گلیسین را خنثی کند و از دناتوره شدن پروتئین هنگام خروج جلوگیری شود. محلول حاصل جمع‌آوری و در انتها OD نمونه جمع‌آوری شده در ۲۸۰ نانومتر به عنوان جذب نوری پروتئین ثبت گردید.

مواجهه CD40L محلول پلاکتی و رده سلولی Daudi در شرایط کشت:

پس از تخلیص CD40L به روش کروماتوگرافی تمایلی، سلول‌های Daudi با CD40L پلاکتی در محیط کشت و در شرایط کاملاً استریل مواجه شدند. برای کشت از فلاسک‌های کشت(چین، Jet Biofil) و محیط کشت RPMI (آمریکا، جیبکو) واجد ۱۰درصد FBS (آمریکا، جیبکو)، ۱ درصد L-گلوتامین(آلمان، مرک) و ۱درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین- استرپتومایسین(آمریکا، جیبکو) استفاده گردید. برای مواجهه، سه ردیف اول هر پلیت کشت سلولی به عنوان چاهک‌های آزمایش در نظر گرفته شد و تعداد سلول‌های سوش Daudi (1×10^5 در میلی‌لیتر)، غلظت CD40L محلول(۵۰۰، ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)(با توجه به مطالعه اولیه در چند غلظت، دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر انتخاب گردید) و محیط کشت RPMI به آن افزوده شد و سایر مواد افزودنی به نحوی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

انتخاب گردید که حجم هر چاهک پلیت ۱ میلی‌لیتر باشد. چاهک‌های ردیف آخر به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد، به عنوان کنترل از سلول Daudi بدون افزودن CD40L محلول استفاده شد. پس در این مطالعه گروه مداخله، سلول‌های Daudi همراه با CD40L محلول و گروه کنترل، سلول‌های Daudi بدون افزودن CD40L محلول بودند. در پایان این مرحله ، پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO2 دار برای مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه گردید.

نمونه‌برداری از محیط کشت:

پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از مواجهه CD40L محلول و سلول Daudi نمونه‌برداری انجام شد، بدین منظور در روز دوم کشت در شرایط کاملاً استریل، تعدادی از چاهک‌های پلیت مورد نظر(از هر غلظت یکی از چاهک‌ها و دو تا از چاهک‌های کنترل) به طور کامل داخل میکروتیوب‌ها منتقل شدند.

شمارش سلولی با تریپان‌بلو صورت گرفت و از حیات سلول‌ها اطمینان حاصل شد. میکروتیوب‌ها در دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. تکمه سلولی میکروتیوب‌ها به حالت سوسپانسیون در آمد و بعد از یکبار شست‌وشو با PBS استریل، حدود ۲۰۰ میکرولیتر از PBS جهت رسیدن سلول‌ها به یک میلیون به هر میکروتیوب اضافه شد. سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند. از کیت MTT (UK ، رُوش) جهت بررسی بقای سلول‌ها استفاده شد. بدین منظور از هر میکروتیوب ۵۰ میکرولیتر سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و سپس ۵ میکرولیتر محلول MTT اضافه گردید و سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 گرماگذاری شد. پس از آن به هر چاهک، ۴۰ میکرولیتر از محلول حل‌کننده رسوب کیت MTT اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار داده شد.

بعد از این مدت، در ۵۷۰ نانومتر جذب آن خوانده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول باقی مانده جهت بررسی بیان CD27 با استفاده از فلوسیتومتری مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی شاخص فعالیت سلول‌های B با انجام فلوسیتومتری برای بیان CD27:

جهت انجام فلوسیتومتری از دستگاه سیس‌مکس (آلمان، Norderstedt) استفاده شد. در ابتدا سلول‌ها در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده، استفاده شد. تعداد 1×10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به داخل میکروتیوب منتقل گردید. ۲ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد CD27 (آبکام، کمبریج انگلیس Clone mumber LT27) به نمونه‌ها اضافه شد. به مدت ۴۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحله بعد دو بار شستشو با PBS و سانتریفیوژ در دور rpm ۱۵۰۰ انجام گردید. سپس محلول رویی تخلیه شده و به رسوب باقی مانده از مرحله قبل ۲ میکرولیتر از IgG موشی کونژوگه با FITC، F(ab)′2 (داکو – آلمان) اضافه و با PBS به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه برای ۴۰ دقیقه در یخچال و در تاریکی انکوبه گردید.

بعد از گذشت زمان انکوباسیون، نمونه‌ها به داخل لوله‌های فلوسیتومتری منتقل شد و با دستگاه فلوسیتومتری از نظر بیان CD27 مورد آنالیز قرار گرفتند. جهت اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها از کنترل ایزوتیپ کونژوگه با FITC استفاده شد.

آنالیز داده‌ها:

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (۲۶ version) انجام شد. در این مطالعه از آزمون‌های من‌ویتنی و Independent two Sample Test جهت مقایسه گروه کنترل و مداخله استفاده شد. معناداری آماری در $p< ۰/۰۵$ تنظیم شد.

یافته‌ها

بررسی میزان بقای سلول‌های Daudi با استفاده از روش MTT:

پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از مواجهه سلول‌های Daudi با دو غلظت متفاوت از CD40L تخلیص شده از فرآورده پلاکتی، داده‌های حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

گرفت. نتایج حاصل از بقا و تکثیر سلول‌ها در نمودار نمایش داده شده است(نمودارهای ۱ و ۲).

با توجه به نمودار ۱، بعد از ۴۸ ساعت از مواجهه سلول‌های Daudi با غلظت CD40L ۵۰۰ ng/mL محلول نسبت به حالت کنترل، افزایش بقای سلول‌ها مشاهده شد، اما این اختلاف با توجه به p=۰/۰۵۲ و میانگین (۰/۳۵ ± ۰/۵۸) نسبت به گروه کنترل با میانگین(۰/۱۶ ± ۰/۳۰) معنادار نبود. در ۷۲ ساعت پس از مواجهه نیز با توجه به p=۰/۵ و میانگین(۰/۲۸ ± ۰/۶۰) نسبت به گروه کنترل با میانگین (۰/۳۶ ± ۰/۵۲) افزایش معناداری مشاهده نشد.

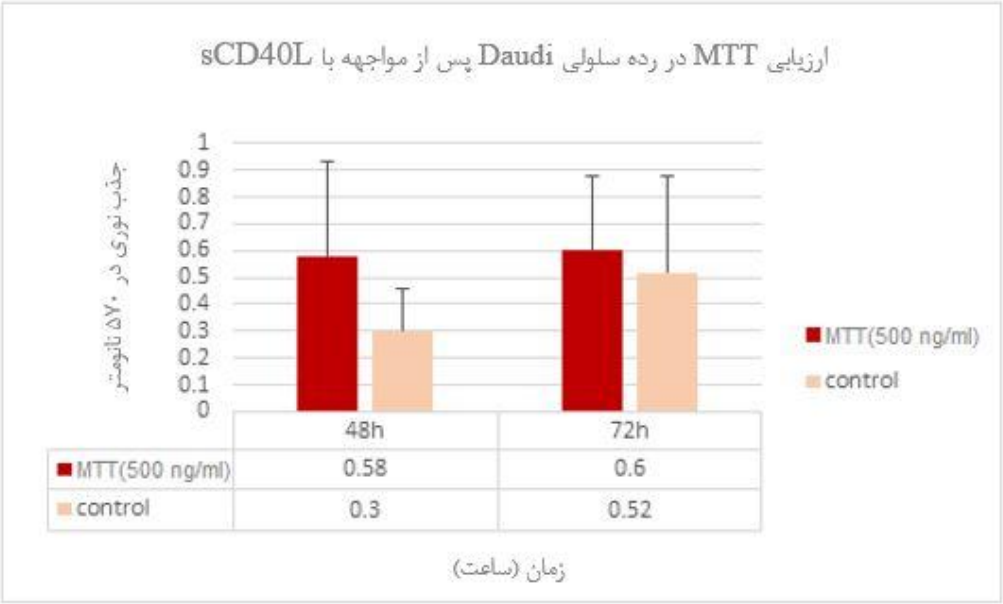
با توجه به نمودار ۲، بعد از ۴۸ ساعت از مواجهه سلول Daudi با غلظت CD40L ۱۰۰۰ ng/mL محلول نسبت به حالت کنترل، افزایش بقای سلول‌ها مشاهده شد، در ۴۸ ساعت پس از مواجهه با توجه به p=۰/۰۴۱ و میانگین ۰/۴۱ ± ۰/۶۱ نسبت به گروه کنترل با میانگین ۰/۱۶ ± ۰/۳۰ معنادار بود. در ۷۲ ساعت پس از مواجهه با توجه به p=۰/۶ و میانگین ۰/۵۵ ± ۰/۶۰ نسبت به گروه کنترل با میانگین ۰/۳۵ ± ۰/۵۵ این افزایش معنادار نبود.

بررسی CD27 بر روی لنفوسیت B با استفاده از فلوسیتومتری:

نتایج حاصل از بررسی بیان CD27 و میزان فعالیت سلول Daudi پس از مواجهه با CD40L محلول در نمودار نمایش داده شده است(نمودارهای ۳ و ۴).

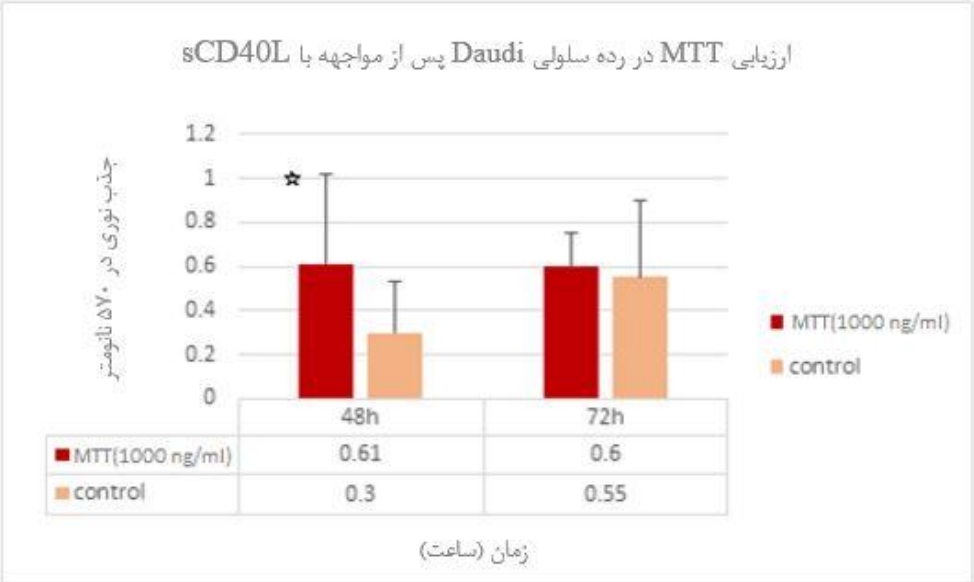
با توجه به نمودار ۳، پس از گذشت ۴۸ ساعت از مواجهه سلول Daudi و sCD40L با غلظت ۵۰۰ ng/mL نسبت به حالت کنترل، افزایش بیان CD27 مشاهده شد، اما این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به p=۰/۴ و میانگین(۳/۸۳ ± ۲۲/۴۹) نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان (۳/۸۳ ± ۲۰/۸۶) در ۴۸ ساعت و p=۰/۱۸ و میانگین بیان (۶/۷۲ ± ۲۴/۰۶) در ۷۲ ساعت پس از مواجهه نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان (۶/۶۵ ± ۲۱/۰۲)، معنادار نبود.

با توجه به نمودار ۴، پس از گذشت ۴۸ ساعت از مواجهه سلول Daudi و sCD40L با غلظت ۱۰۰۰ ng/mL نسبت به حالت کنترل، افزایش بیان CD27 مشاهده شد، این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به

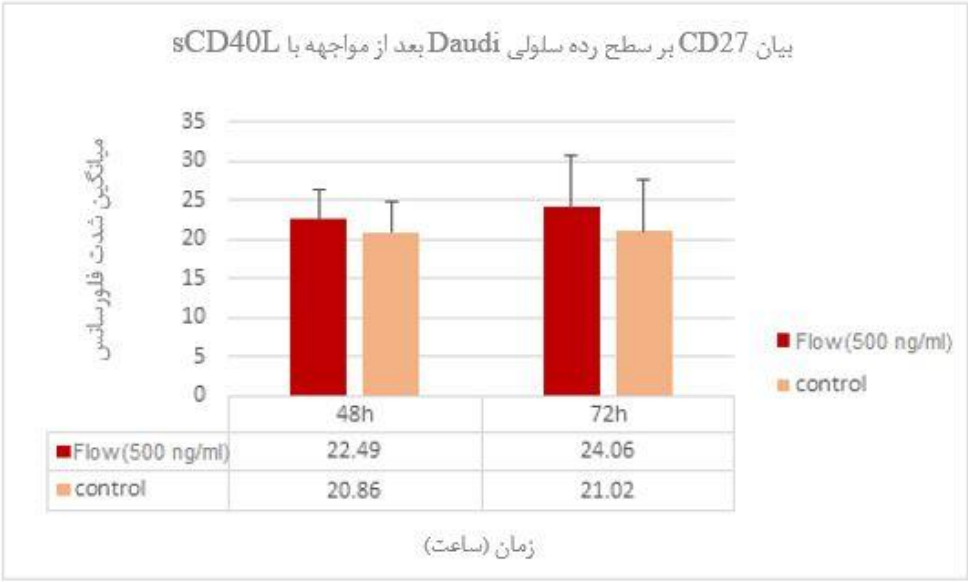


نمودار ۱: ارزیابی میزان بقای سلول‌های Daudi در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر CD40L محلول نشان‌دهنده افزایش بقای سلول Daudi نسبت به کنترل است. اما این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به p< ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از مواجهه معنادار نبود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

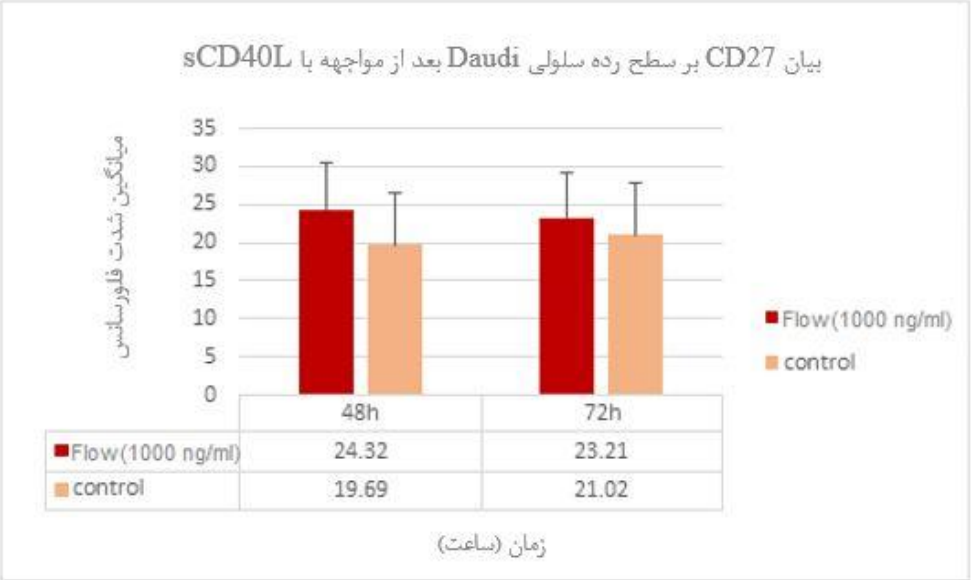


نمودار ۲: ارزیابی میزان بقای سلول‌های Daudi در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر CD40L محلول نشان‌دهنده افزایش بقای سلول Daudi نسبت به کنترل است. در ۴۸ ساعت پس از مواجهه با توجه به p=۰/۰۴۱ معنادار بود(ستون ستاره‌دار). در ۷۲ ساعت پس از مواجهه با توجه به p> ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل این افزایش معنادار نبود.

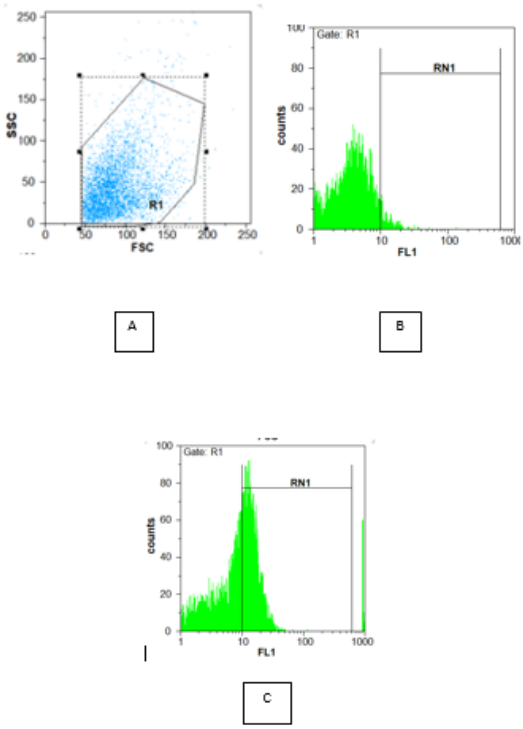


نمودار۳: ارزیابی CD27 پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت از مواجهه رده سلولی Daudi با غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر CD40L محلول نشان‌دهنده افزایش فعالیت سلول Daudi نسبت به کنترل می‌باشد. اما این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به p> ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از مواجهه معنی‌دار نبود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]



نمودار۴: ارزیابی بیان CD27 پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت از مواجهه رده سلولی Daudi با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر CD40L محلول نشان‌دهنده افزایش فعالیت سلول Daudi نسبت به کنترل می‌باشد. این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به p> ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از مواجهه معنادار نبود.



نمودار ۵: نمودارهای مربوط به بیان شاخص فعالیت CD27 برسطح رده سلولی Daudi با استفاده از روش فلوسیتومتری ۴۸ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر CD40L محلول در محیط کشت. A: گیت جمعیت سلولی Daudi بعد از مواجهه سازی. B: نمودار کنترل ایزوتیپ. C: نمودار بیان CD27 بر سطح رده سلولی Daudi مربوط به نمونه تست (سلول Daudi + CD40L محلول)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

p=۰/۲ و میانگین ۶/۰۸ ± ۲۴/۳۲ نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان ۴/۴۳ ± ۱۹/۶۹ در ۴۸ ساعت و p=۰/۵۷ و میانگین بیان ۶/۸۳ ± ۲۳/۲۱ در ۷۲ ساعت پس از مواجهه نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان ۶/۶۵ ± ۲۱/۰۲ معنادار نبود.

در نمودار ۵، بیان CD27 در مقایسه با ایزوتیپ کنترل بر سطح سلول Daudi پس از مواجهه با CD40L محلول نمایش داده شده است. Mean Fluorescence Index (MFI) مشخص شده در نمودار بیانگر میانگین شدت فلورسانس می‌باشد. در واقع، تغییر در شدت فلورسانس جمعیت سلول‌ها است.

بحث

با توجه به اهمیت بالای مولکول CD40L در فعال‌سازی لنفوسیت‌های B و بقای این سلول‌ها، این مطالعه جهت بررسی اثر این مولکول بر رده سلولی Daudi (رده سلولی مشتق از لنفوسیت B) طراحی شد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده افزایش بقای سلول‌های Daudi در مواجهه با sCD40L در غلظت بالاتر به صورت معنادار بود، اما افزایش فعالیت این سلول‌ها و بیان CD27 در هیچ یک از غلظت‌های مورد بررسی، معنادار مشاهده نشد.

مولکول CD40L به میزان بالایی بر سطح لنفوسیت T و پلاکت‌ها بیان می‌شود و در این حالت می‌تواند به فرم محلول(sCD40L) شکسته شود. پلاکت‌ها از طریق CD40L با انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله لنفوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال و گرانولوسیت‌ها در ارتباطند. نتایج و عملکرد دقیق این ارتباطات همیشه مشخص نبوده است اما این موضوع واضح است که در نتیجه این ارتباط‌ها، آزادسازی مدیاتورهایی اتفاق می‌افتد که واکنش آن‌ها را تقویت می‌کند(۱۷). از آن‌جایی که تخمین زده شده است، بیش از ۹۵ درصد CD40L محلول در گردش خون، مشتق از پلاکت‌هاست (۱۸)، مطالعه این مولکول در فرآورده پلاکتی بر فعال‌سازی و بقای لنفوسیت B نقش بسیار مهمی دارد.

در این مطالعه سعی شده است تا تاثیر CD40L محلول بر فعال شدن رده سلولی Daudi و هم‌چنین بقای این سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد. از این جهت CD40L پلاکتی از کیسه‌های پلاکت در ۳ روز پس از ذخیره‌سازی تخلیص گردید و با رده سلولی Daudi در شرایط کشت (*in vitro*) مواجه شد. در روزهای مختلف مواجهه (۴۸ و ۷۲ ساعت) نمونه‌برداری از چاهک‌های کشت انجام شد و با نمونه‌های آزمایش از نظر بیان شاخص CD27 با استفاده از روش فلوسیتومتری و از نظر بقا و تکثیر با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

اولین مطالعه انجام شده مرتبط با تاثیر CD40L بر لنفوسیت‌های B ، گزارش بانچرا و همکارانش در سال ۱۹۹۱ در مورد سیستم CD40 بود. نتایج حاصل از این مطالعه بیان کرد که سیستم CD40 برای تحریک لنفوسیت‌های B با طول عمر بالا در آزمایشگاه ضروری می‌باشند. در این مطالعه از راه‌کارهای متفاوتی جهت تحریک CD40، از قبیل آنتی‌بادی‌های منوکلونال آگونیست CD40 و استفاده از پروتئین‌های نوترکیب استفاده شد(۱۹).

بیشتر مطالعه‌های انجام شده در حوزه تاثیر CD40L بر فعال‌سازی لنفوسیت B، به فرم غشایی آن پرداخته‌اند. در مطالعه انجام شده در سال ۱۹۹۲، اسپریگز و همکارانش در رده سلولی CV1/EBNA، ژن *CD40L* را کلون کرده و اثر آن را بر فعال‌سازی سلول B و تولید آنتی‌بادی IgE از آن مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آن‌ها بیان‌گر افزایش فعال‌سازی و تولید IgE در کشت هم‌زمان CD40L غشایی و لنفوسیت B خون محیطی بود(۲۰).

در مطالعه‌ای که توسط فابریک کوگناس و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در فرانسه انجام شد، نشان داده شد که در کشت هم‌زمان پلاکت همراه با لنفوسیت B در محیط آزمایشگاه، هر دو سلول فعال می‌شوند. در این حالت، شاخص‌های فعال‌سازی CD62P در سطح پلاکت‌ها و CD86 و CD27 در سطح سلول‌های B افزایش، اما شاخص IgD کاهش می‌یابد. هم‌چنین بیان کرد که واکنش پلاکت‌ها و لنفوسیت‌های B از طریق ارتباط متقابل CD40-CD40L صورت می‌پذیرد(۲۱).

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۸ توسط دکتر یاری و همکارانش، تاثیر میکروپارتیکل‌های پلاکتی بر بیان مارکرهای CD27 و CD86 بر سطح سلول‌های Daudi مورد

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آن مطالعه، میکروپارتیکل‌های پلاکتی از طریق مارکرهای سطحی خود که همان مارکرهای پلاکتی هستند، قادر به فعال کردن و تمایز سلول‌های نامیرا Daudi می‌باشند. در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر CD40L محلول پلاکتی بر بقا و بیان مارکر فعالیت یک رده سلولی از لنفوسیت B پرداختیم و نتایج حاصل، بیان کننده توانایی CD40L محلول تا حدودی در افزایش فعالیت و تمایز سلول Daudi بود(۲۲).

پیش از این به تاثیر پلاکت‌ها بر سلول‌های B خون محیطی اشاره شده است(۲۱-۱۷)، اما مطالعه‌هایی که با این موضوع سر و کار دارند، بیشتر بر فرم غشایی CD40L و تاثیر آن بر لنفوسیت‌های خون محیطی تمرکز داشته‌اند. در این جا قصد داشتیم توانایی CD40L محلول مشتق از کنسانتره پلاکتی را بر فعال کردن و بقای سلول‌های Daudi به عنوان یک رده سلولی برای لنفوسیت‌های B خون محیطی ارزیابی کنیم. به دلیل جهش به طور طبیعی یا القا شده، یک رده سلولی جاودانه می‌تواند برای زمان‌های طولانی در شرایط *in vitro* رشد کند. هم‌چنین به دست آوردن تعداد کافی از این سلول‌ها از طریق کشت سلولی آسان‌تر از جداسازی لنفوسیت‌های B خون محیطی از خون کامل انسان است. از آن‌جایی که تأثیر مولکول CD40L بر فعال‌سازی و تحریک لنفوسیت‌های B از اهمیت بالایی برخوردار است و بیشترین میزان CD40L گردش خون از پلاکت‌ها حاصل می‌شود، بررسی تاثیر این مولکول بر فعال‌سازی و بقای لنفوسیت‌های B اولین گام در تولید آنتی‌بادی از این سلول‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

حاصل این مطالعه، بررسی فعالیت و بقای سلول‌های Daudi در مواجهه با مولکول با اهمیت CD40L بوده است که در غلظت‌های بالاتر sCD40L تا حدودی بر بقای سلول Daudi تاثیرگذار بوده و افزایش غیر معنادار بیان CD27 نیاز به فراهم کردن مولکول‌های تاثیرگذار دیگر هم‌چون سیتوکاین‌ها در محیط کشت سلول را بیان می‌کند. در ارتباط با اثرگذاری این مولکول در مطالعه‌های آتی نیاز به طراحی جدید و وجود مولکول‌های تاثیرگذار دیگر جهت ارسال سیگنال‌های لازم به سلول ضروری باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی و طب انتقال خون مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1397.037 می‌باشد. بودجه این مطالعه توسط مؤسسه آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل عملی پروژه در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون انجام شده است.

References:

1- Michel NA, Zirlik A, Wolf D. CD40L and its receptors in atherothrombosis-an update. Front Cardiovasc Med 2017; 4: 40.
2- Ludewig B, Henn V, Schröder JM, Graf D, Kroczek RA. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells. Eur J Immunol 1996; 26(12): 3137-43.
3- Graf D, Müller S, Korthäuer U, van Kooten C, Weise C, Kroczek RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. Eur J Immunol 1995; 25(6): 1749-54.
4- Tang TT, Cheng X, Truong B, Sun L, Yang X, Wang H. Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint. Pharmacol Ther 2021; 219: 107709.
5- Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunol Rev 2009; 229(1): 152-72.
6- van Kooten C, Banchereau J. CD40- CD40 ligand. J Leukoc Biol 2000; 67(1): 2-17.
7- Karnell JL, Rieder SA, Ettinger R, Kolbeck R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. Adv Drug Deliv Rev 2019; 141: 92-103.
8- Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. Annu Rev Immunol 1998; 16(1): 111-35.
9- Cognasse F, Lafarge S, Chavarin P, Acquart S, Garraud O. Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9. Intensive Care Med 2007; 33(2): 382-4.
10- Corash L, Cognasse F, Osselaer JC, Messe N, Van Hooydonk M, Garraud O. Cytokines in platelet components associated with acute transfusion

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

reactions: The role of sCd40L. Blood 2006; (108)11: 952.
11- Nomura S, Fujita S, Nakanishi T, Yokoi T, Shimamoto K, Miyamoto R, *et al*. Platelet-derived microparticles cause CD154-dependent activation of dendritic cells. Platelets 2012; 23(1): 81-2.
12- 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.
13- Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. Thromb Res 2011; 127(3): 180-3.
14- Seong R, Clayberger CA, Krensky AM, Parnes JR. Rescue of Daudi cell HLA expression by transfection of the mouse beta 2-microglobulin gene. J Exp Med 1988; 167(2): 288-99.
15- Rosa F, Fellous M, Dron M, Tovey M, Revel M. Presence of an abnormal β 2-microglobulin mRNA in Daudi cells: induction by interferon. Immunogenetics 1983; 17(2): 125-31.
16- Borst J, Hendriks J, Xiao Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. Curr Opin Immunol 2005; 17(3): 275-81.
17- Aloui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, *et al*. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. Int J Mol Sci 2014; 15(12): 22342-64.
18- Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. Throm Haemost 2009; 102(2): 206-14.
19- Banchereau J, Rousset F. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. Nature 1991; 353(6345): 678-9.
20- Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, *et al*. Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. J Exp Med 1992; 176(6): 1543-50.
21- Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Chavarin P, Cogné M, Richard Y, *et al*. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. Exp Hematol 2007; 35(9): 1376-87.
22- Yari F, Motefaker M, Nikougoftar M, Khayati Z. Interaction of platelet-derived microparticles with a human B-lymphoblast cell line: A clue for the immunologic function of the microparticles. Transfus Med Hemother 2018; 45(1): 55-61.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2021;18 (3): 161-170

Original Article

The effect of sCD40L derived from platelet concentrate on cell survival and activation of Daudi cells

Nemati A.[1], Yari F.[1], Mohammadipour M.[1], Rezaei N.[2]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[2]*Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Previous studies have suggested an association between the importance of CD40L and B lymphocytes. CD40L derived from platelets plays an important role in the activation of B lymphocytes and humoral immunity. The aim of the present study was to investigate the effect of purified CD40L from platelet product on the survival and activation of Daudi cells as an available surrogate cell line for peripheral blood B lymphocytes.

Materials and Methods

In an experimental study, Purified CD40L from platelet product was exposed to Daudi cells at concentrations of 500 and 1000 ng/mL. After 48 and 72 hours of exposure, cell survival was studied with MTT assay and CD27 expression with flow cytometry. SPSS software and Independent T Test and Mann-Whitney tests were used for statistical analysis.

Results

The results showed a significant increase in cell survival at 48 hours after exposure to 1000 ng/mL of CD40L with $p = 0.04$ (0.61 ± 0.41) compared to the control group with the mean of 0.30 ± 0.15 while in 500 ng/mL with (0.58 ± 0.35), it was insignificant. CD27 expression did not show a significant increase in all concentrations.

Conclusions

Soluble CD40L has been effective in the survival of Daudi cells at higher concentrations. A slight increase in CD27 as one of the activation markers of B lymphocytes suggests the need to provide more appropriate conditions such as the use of cytokines in the cell culture medium.

Key words: Platelets, Survival, B-Lymphocytes

Received: 28 Oct 2020
Accepted: 23 Dec 2020

Correspondence: Yari F., PhD of Immunology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052237; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *f.yari@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2022-01-20]