

تأثیر CD40L محلول به دست آمده از کنسانتره پلاکتی بر بقا و فعال سازی سلول های Daudi

آتوسا نعمتی^۱، فاطمه یاری^۲، مهشید محمدی پور^۳، نگار رضایی^۴

چکیده

سابقه و هدف

مطالعه های پیشین به ارتباط مهم CD40L با لنفوسیت B اشاره کرده اند. CD40L پلاکتی نقش مهمی در فعال سازی لنفوسیت B و ایمنی هومورال ایفا می کند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر CD40L تخلیص شده از فرآورده پلاکتی بر بقا و فعال سازی سلول های Daudi به عنوان یک رده سلولی در دسترس برای لنفوسیت های B خون محیطی بود.

مواد و روش ها

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 نرم افزار SPSS ۲۶ و آزمون های آماری Independent two Sample Test و Mann-Whitney استفاده شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده نشان دهنده افزایش بقای سلول ها در ۴۸ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ ng/mL با $p=0/04$ و میانگین $0/41 \pm 0/61$ نسبت به گروه کنترل با میانگین $0/15 \pm 0/30$ معنادار و در غلظت ۵۰۰ و میانگین $0/35 \pm 0/58$ غیر معنادار بود. میانگین بیان CD27 در تمامی غلظت ها افزایش معناداری نشان نداد.

نتیجه گیری

CD40L محلول در بقای سلول های Daudi در غلظت های بالاتر تأثیرگذار بوده است و افزایش غیر معنادار بیان CD27 به عنوان یکی از مارکرهاى فعال سازی لنفوسیت B، نیاز به فراهم کردن شرایط مناسب تر هم چون استفاده از سیتوکاین ها در محیط کشت سلول را بیان می کند.

کلمات کلیدی: پلاکت ها، بقا، لنفوسیت های B

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳

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

۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۳- PhD ژنتیک مولکولی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- PhD اپیدمیولوژی - استادیار مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم - پژوهشگاه علوم بالینی غدد - پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران

مقدمه

CD40L (CD154)، عضو خانواده بزرگ فاکتور نکروز تومور، یک مولکول محرک است که برای اولین بار در سلول های T فعال کشف شد (۱). این مولکول از محل متیونین ۱۱۳ دومین خارج سلولی شکسته و به فرم محلول ترشح می شود (۳، ۲). لنفوسیت های B، آنتی ژن های سطح سلول و آنتی ژن های محلول داخل سلولی را شناسایی می کنند و به پلاسما سل های تولید کننده آنتی بادی تمایز می یابند. علاوه بر سلول های T، پلاکت ها نیز با فعال شدن، سطوح بالایی از CD40L را بیان می کنند (۴). اصلی ترین رسپتور آن مولکول CD40 است که توسط سلول های ایمنی و غیر ایمنی بیان می شود (۷-۵). فعال شدن CD40 سیگنال های حیاتی برای فعالیت، تمایز و ترشح ایمنوگلوبولین ها از لنفوسیت B را فراهم می کند (۸).

طبق مطالعه های گذشته، تخمین زده شده است که بیش از ۹۵ درصد از CD40L محلول (sCD40L) در گردش خون، مشتق از پلاکت ها است (۱۰، ۹). این مولکول نقشی محوری در تنظیم پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی از طریق میان کنش CD40L-CD40 دارد (۱۲، ۱۱). راتلیف و همکارانش نشان دادند که در پاسخ ایمنی اولیه، زمانی که تعداد لنفوسیت های $CD4^+$ کم است، CD40L محلول حاصل از پلاکت ها، سیگنال های اولیه برای تکثیر لنفوسیت های B را فراهم می کند (۱۳).

رده سلولی Daudi یک رده سلولی لنفوبلاستوئید B مشتق از لنفوم بورکیت است (۱۴). تفاوت عمده بین لنفوسیت های اولیه B و سلول های Daudi، عدم وجود کلاس I HLA در سطح این سلول ها است (۱۵). مطالعه ها نشان داده اند که یکی از مارک های فعال سازی لنفوسیت B، CD27 می باشد (۱۶). بدین منظور جهت بررسی فعال سازی 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 فعال سازی لنفوسیت های B بیش تر مشخص شود.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

تخلیص پروتئین به وسیله کروماتوگرافی تمایلی:

۵ میلی لیتر از محلول رویی فرآورده پلاکتی (پلاسمای فاقد میکروپار تیکل های پلاکتی)، با ۵ میلی لیتر از PBS رقیق شد و سپس شیر ستون بسته شد و نمونه به آرامی وارد ستون گردید.

به منظور خروج پروتئین های متصل نشده یا پروتئین های متصل غیر اختصاصی و یا سست، ستون چندین مرتبه با بافر PBS شست و شو داده شد. با استفاده از بافر گلیسین ۰/۱ مولار (pH برابر با ۲/۸) شستشو صورت گرفت و محلول خروجی جمع آوری گردید. از قبل در لوله های جمع آوری نمونه، ۱۰۰ میکرو لیتر 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 جمع آوری و در انتها OD نمونه جمع آوری 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، سلول های Daudi با CD40L پلاکتی در محیط کشت و در شرایط کاملاً استریل مواجه شدند. برای کشت از فلاسک های کشت (چین، Jet Biofil) و محیط کشت RPMI (آمریکا، جیبکو) واجد ۱۰ درصد FBS (آمریکا، جیبکو)، ۱ درصد L-گلوتامین (آلمان، مرک) و ۱ درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین - استرپتومایسین (آمریکا، جیبکو) استفاده گردید. برای مواجهه، سه ردیف اول هر پلیت کشت سلولی به عنوان چاهک های آزمایش در نظر گرفته شد و تعداد سلول های سوش Daudi (1×10^5 در میلی لیتر)، غلظت CD40L محلول (۵۰۰، ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر) (با توجه به مطالعه اولیه در چند غلظت، دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر انتخاب گردید) و محیط کشت RPMI به آن افزوده شد و سایر مواد افزودنی به نحوی

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

جهت انجام فلوسیتومتری از دستگاه سیس مکس (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 number 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 $p < 0.05$ 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

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 rpm ۱۵۰۰ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 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).

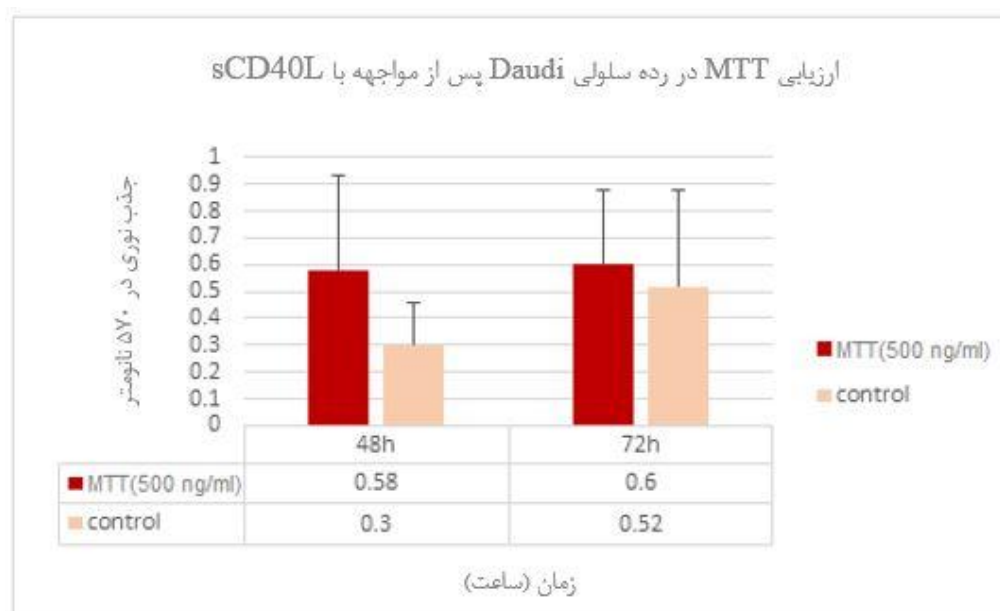
با توجه به نمودار ۳، پس از گذشت ۴۸ ساعت از مواجهه سلول Daudi و sCD40L با غلظت ۵۰۰ ng/mL نسبت به حالت کنترل، افزایش بیان CD27 مشاهده شد، اما این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به $p=0/4$ و میانگین $(22/49 \pm 3/83)$ نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان $(20/86 \pm 3/83)$ در ۴۸ ساعت و $p=0/18$ و میانگین بیان $(24/06 \pm 6/72)$ در ۷۲ ساعت پس از مواجهه نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان $(21/02 \pm 6/65)$ ، 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

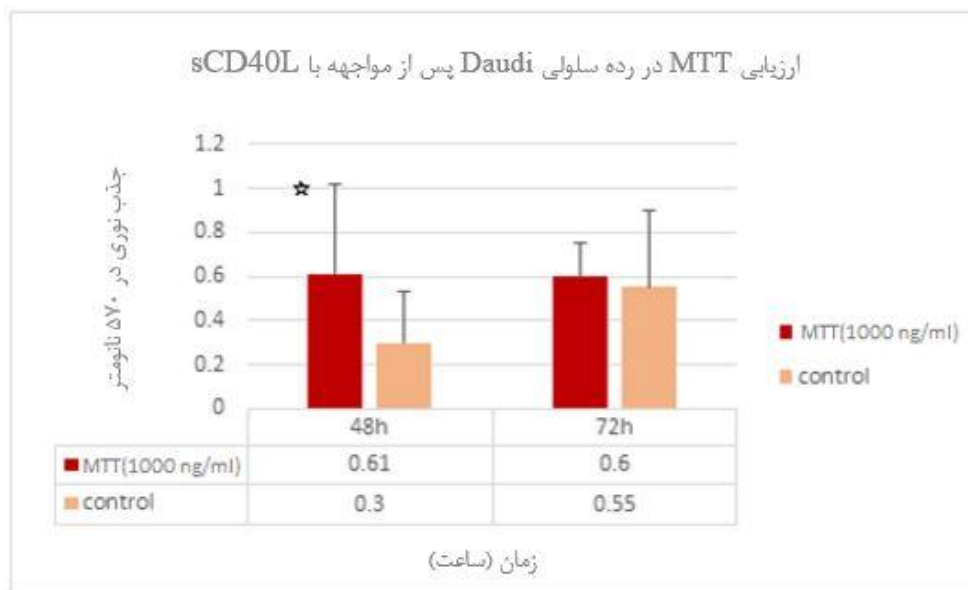
گرفت. نتایج حاصل از بقا و تکثیر سلول‌ها در نمودار نمایش داده شده است (نمودارهای ۱ و ۲).

با توجه به نمودار ۱، بعد از ۴۸ ساعت از مواجهه سلول‌های Daudi با غلظت ۵۰۰ ng/mL CD40L محلول نسبت به حالت کنترل، افزایش بقای سلول‌ها مشاهده شد، اما این اختلاف با توجه به $p=0/052$ و میانگین $(0/35 \pm 0/58)$ نسبت به گروه کنترل با میانگین $(0/30 \pm 0/16)$ معنادار نبود. در ۷۲ ساعت پس از مواجهه نیز با توجه به $p=0/5$ و میانگین $(0/28 \pm 0/60)$ نسبت به گروه کنترل با میانگین $(0/36 \pm 0/52)$ افزایش معناداری مشاهده نشد.

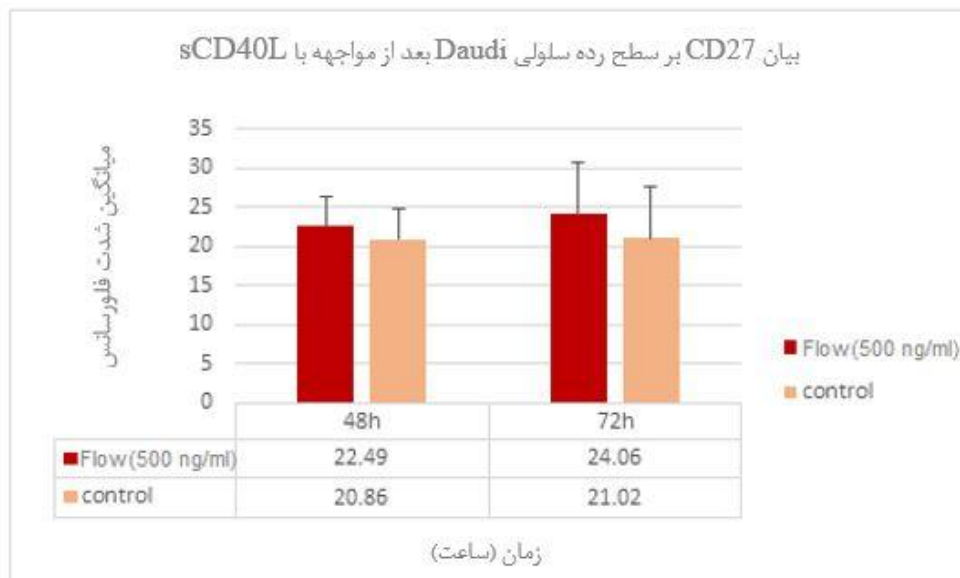
با توجه به نمودار ۲، بعد از ۴۸ ساعت از مواجهه سلول Daudi با غلظت ۱۰۰۰ ng/mL CD40L محلول نسبت به حالت کنترل، افزایش بقای سلول‌ها مشاهده شد، در ۴۸ ساعت پس از مواجهه با توجه به $p=0/041$ و میانگین $(0/41 \pm 0/61)$ نسبت به گروه کنترل با میانگین $(0/16 \pm 0/30)$ معنادار بود. در ۷۲ ساعت پس از مواجهه با توجه به $p=0/6$ و میانگین $(0/55 \pm 0/60)$ نسبت به گروه کنترل با میانگین $(0/35 \pm 0/55)$ این افزایش معنادار نبود.



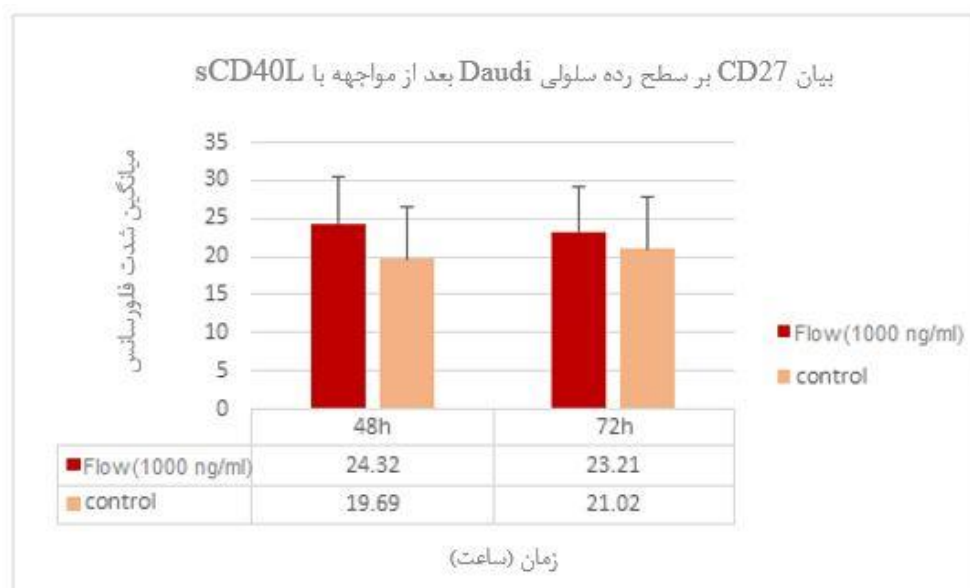
نمودار ۱: ارزیابی میزان بقای سلول‌های Daudi در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر CD40L محلول نشان‌دهنده افزایش بقای سلول Daudi نسبت به کنترل است. اما این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به $p > 0/05$ نسبت به گروه کنترل در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از مواجهه معنادار نبود.



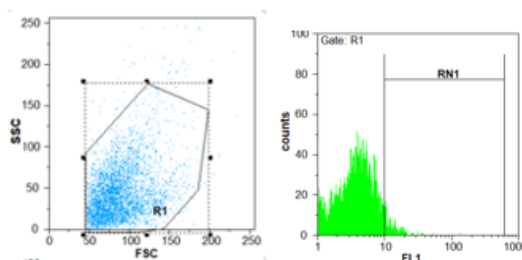
نمودار ۲: ارزیابی میزان بقای سلول‌های Daudi در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر CD40L محلول نشان‌دهنده افزایش بقای سلول Daudi نسبت به کنترل است. در ۴۸ ساعت پس از مواجهه با توجه به $p=۰/۰۴۱$ معنادار بود (ستون ستاره‌دار). در ۷۲ ساعت پس از مواجهه با توجه به $p>۰/۰۵$ نسبت به گروه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



نمودار ۳: 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.

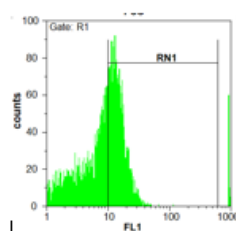


نمودار ۴: ارزیابی بیان CD27 پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت از مواجهه رده سلولی Daudi با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر CD40L محلول نشان دهنده افزایش فعالیت سلول Daudi نسبت به کنترل می باشد. این افزایش در هر دو زمان مورد بررسی با توجه به $p > 0.05$ نسبت به گروه کنترل در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از مواجهه معنادار نبود.



A

B



C

نمودار ۵: نمودارهای مربوط به بیان شاخص فعالیت CD27 بر سطح رده سلولی Daudi با استفاده از روش فلوسیتومتری ۴۸ ساعت پس از مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر 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)

$p=0/2$ و میانگین $6/08 \pm 24/32$ نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان $4/43 \pm 19/69$ در ۴۸ ساعت و $p=0/57$ و میانگین بیان $6/83 \pm 23/21$ در ۷۲ ساعت پس از مواجهه نسبت به گروه کنترل با میانگین بیان $6/65 \pm 21/02$ 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 می باشد. در واقع، تغییر در شدت فلورسانس جمعیت سلول ها است.

بحث

با توجه به اهمیت بالای مولکول CD40L در فعال سازی لنفوسیت های B و بقای این سلول ها، این مطالعه جهت بررسی اثر این مولکول بر رده سلولی Daudi (رده سلولی مشتق از لنفوسیت B) طراحی شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده افزایش بقای سلول های Daudi در مواجهه با sCD40L در غلظت بالاتر به صورت معنادار بود، اما افزایش فعالیت این سلول ها و بیان CD27 در هیچ یک از غلظت های مورد بررسی، معنادار مشاهده نشد.

مولکول CD40L به میزان بالایی بر سطح لنفوسیت T و پلاکت ها بیان می شود و در این حالت می تواند به فرم محلول (sCD40L) شکسته شود. پلاکت ها از طریق CD40L با انواع مختلفی از سلول ها از جمله لنفوسیت ها و سلول های اندوتلیال و گرانولوسیت ها در ارتباطند. نتایج و عملکرد دقیق این ارتباطات همیشه مشخص نبوده است اما این موضوع واضح است که در نتیجه این ارتباط ها، آزاد سازی مدیاتورهایی اتفاق می افتد که واکنش آن ها را تقویت می کند (۱۷). از آنجایی که تخمین زده شده است، بیش از ۹۵ درصد CD40L محلول در گردش خون، مشتق از پلاکت هاست (۱۸)، مطالعه این مولکول در فرآورده پلاکتی بر فعال سازی 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 هم چنین بقای این

سلول ها مورد بررسی قرار گیرد. از این جهت CD40L پلاکتی از کیسه های پلاکت در ۳ روز پس از ذخیره سازی تخلیص گردید و با رده سلولی Daudi در شرایط کشت (in vitro) مواجه شد. در روزهای مختلف مواجهه (۴۸ و ۷۲ ساعت) نمونه برداری از چاهک های کشت انجام شد و با نمونه های 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 لنفوسیت های 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 لنفوسیت های B با طول عمر بالا در آزمایشگاه ضروری می باشند. در این مطالعه از راه کارهای متفاوتی جهت تحریک CD40، از قبیل آنتی بادی های منوکلونال آگونیست CD40 و استفاده از پروتئین های نو ترکیب استفاده شد (۱۹). بیشتر مطالعه های انجام شده در حوزه تاثیر CD40L بر فعال سازی لنفوسیت B، به فرم غشایی آن پرداخته اند. 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 فعال سازی سلول B و تولید آنتی بادی IgE از آن مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آن ها بیان گر افزایش فعال سازی و تولید IgE در کشت هم زمان CD40L غشایی و لنفوسیت B خون محیطی بود (۲۰).

در مطالعه ای که توسط فابریک کوگناس و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در فرانسه انجام شد، نشان داده شد که در کشت هم زمان پلاکت همراه با لنفوسیت B در محیط آزمایشگاه، هر دو سلول فعال می شوند. در این حالت، شاخص های فعال سازی CD62P در سطح پلاکت ها و CD86 و CD27 در سطح سلول های B افزایش، اما شاخص IgD کاهش می یابد. هم چنین بیان کرد که واکنش پلاکت ها و لنفوسیت های B از طریق ارتباط متقابل CD40-CD40L صورت می پذیرد (۲۱).

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

پلاکت ها حاصل می شود، بررسی تاثیر این مولکول بر فعال سازی و بقای لنفوسیت های B اولین گام در تولید آنتی بادی از این سلول ها می باشد.

نتیجه گیری

حاصل این مطالعه، بررسی فعالیت و بقای سلول های Daudi در مواجهه با مولکول با اهمیت CD40L بوده است که در غلظت های بالاتر sCD40L تا حدودی بر بقای سلول Daudi تاثیر گذار بوده و افزایش غیر معنادار بیان CD27 نیاز به فراهم کردن مولکول های تاثیر گذار دیگر هم چون سیتوکاین ها در محیط کشت سلول را بیان می کند. در ارتباط با اثر گذاری این مولکول در مطالعه های آتی نیاز به طراحی جدید و وجود مولکول های تاثیر گذار دیگر جهت ارسال سیگنال های 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 می باشد. 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, Kroczeck 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, Kroczeck 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

- 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.

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

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Endocrinology 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