Archive of SID

کومش- جلد ۱۷، شماره ۳ (پیاپی ۵۹)، بهار ۱۳۹۵

بررسی اثر [illegible] زمان های [illegible] انتریفیوژ و [illegible]ان فریز [illegible] بر مقدار میکروپارتیکل تولید شده [illegible] کنسانتره پلاکتی

طاهره منوچهرآبادی[1](M.Sc)، زهره شریفی [1*](Ph.D)، فاطمه یاری[1](Ph.D)، الهام رضوانی بروجنی[2](M.Sc)، حمیده میرشفیعی[2](Ph.D)، مهین نیکوگفتار [1](Ph.D)، قاسم حسن‌نژاد [1](M.Sc)

۱- مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

[illegible] و هدف: [illegible] اصلی [illegible] اسازی میکروپارتیکل های پلاکتی(PMP) [illegible] دور سانتریفیوژ [illegible]ان می‌باشد. [illegible] به هزینه بالای تعیین تعداد PMP از طریق میکروذرات (micro-bead) و همچنین [illegible] استفاده از [illegible] تگاهی و هزینه بالای فلوسایتومتر، به نظر می رسد تعیین غلظت PMP [illegible] ش برادفورد روشی ارزان، سریع و [illegible] فه می‌باشد. بنابراین در این مطالعه تاثیر فاکتورهای [illegible] زمان های مختلف سانتریفیوژ [illegible]ان فریز [illegible]ن بر غلظت میکروپارتیکل های کیسه های پلاکتی [illegible] انتره بررسی شد.

[illegible] و روش‌ها: [illegible] تفاوت سانتریفیوژ برای [illegible] اسازی میکروپارتیکل‌ها بررسی شد. برای تهیه پلاسمای فنی [illegible] پلاکتی [illegible] پروتکل اول، کیسه پلاکتی در g ۱۵۰۰ [illegible] دقیقه min۱۵ و [illegible] پروتکل دوم، در g ۵۰۰ [illegible] ا [illegible] زمان [illegible] انتریفیوژ گردید برای [illegible] رسی اثر [illegible]، جداسازی میکروپارتیکل‌ها در g ۱۶۰۰۰ [illegible] قیقه min ۲۰ و min ۲ انجام گردید [illegible] ور بررسی غلظت PMP [illegible] برادفورد استفاده شد. برای [illegible] رسی اثر فریز [illegible] بعد از تهیه PRP در g ۳۰۰ [illegible] دقیقه min ۲۰ [illegible] ولیه‌ها در c°۸۰- فریز شدند. تعیین هویت میکروپارتیکل‌ها توسط آنالیز فلوسیتومتری انجام شد.

[illegible] افته‌ها: غلظت PMP [illegible] پلاسمای فنی [illegible] پلاکت حاصل از دور سانتریفیوژ g ۱۵۰۰ غلظت بالاتری [illegible] ان داد (p value≤۰/۰۵)، غلظت PMP بین زمان‌های min۲ و min ۲۰ [illegible] انتریفیوژ تفاوت معناداری [illegible] ان نداد (p value≥۰/۰۵) و [illegible] بررسی اثر فریز [illegible] داده شد که تولید PMP [illegible] روز اول در تمام [illegible] ها افزایش معنی‌دار یافته بود. میکروپارتیکل‌ها دارای مارکر CD41 بودند که بیانگر منشا پلاکتی آن‌هاست.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش دور سانتریفیوژ منجر به تولید مقادیر بیش‌تری میکروپارتیکل می‌گردد. ولی افزایش زمان جداسازی در [illegible] هم اثر معناداری بر مقدار PMP [illegible] نداشت. هم‌چنین می‌توان با استفاده از فریز می‌توان به مقادیر بیش‌تری PMP دست یافت.

واژه‌های کلیدی: پلاکت‌های خون، انتریفیوژ، فریزر، میکروپارتیکل‌ها.

مقدمه

پلاکت‌ها در طی فعال شدن، نگهداری و آپوپتوز، میکروپارتیکل‌هایی تولید می‌کنند که می‌توانند مولکول‌های

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۰۵۲۲۳۳ - ۰۲۱

Email: z.sharifi@ibto.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۱۴

www.SID.ir

Archive of SID

چسبندگی سطحی و مولکول‌هایی نظیر اسید آراشیدونیک را انتقال دهند [۱]. بیان بالای میکروپارتیکل‌ها با شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک مختلفی مرتبط است که شامل چسبندگی سلول، آپوپتوز، پاسخ ایمنی، عمل‌کرد عروق، تغییر شکل عروق و آنژیوژنز، هموستاز و ترومبوز، بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، عفونت، حاملگی نرمال یا پاتولوژیک می‌باشد [۳،۲].

برای بررسی نقش PMP با توجه به نوع مطالعه و مقدار مورد نیاز، جداسازی PMP از پلاکت ضروری است. بدین منظور روش‌های متنوعی وجود دارد. در برخی مطالعات پلاکت‌ها با استفاده از مواد آگونیست مثل ترومبین فعال شده و سپس PMP ها جدا می‌شوند [۴-۶]. در برخی دیگر، PMPهای تولیدشده در طی نگه‌داری از کیسه پلاکت کنسانتره جدا می‌شوند [۷]. برخی محققین نیز از روش فریز- ذوب استفاده می‌کنند [۸].

مرسوم‌ترین روش تهیه PMP استفاده از سانتریفیوژ می‌باشد اما در مقالات متفاوت تعداد دورهای ذکر شده برای تهیه پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) بسیار متنوع می‌باشد. برای مثال در مطالعه Nielsen از دور g ۱۸۰۰ سانتریفیوژ استفاده شده در حالی‌که در برخی منابع از دور سانتریفیوژ g ۲۰۰ استفاده شده است [۱۰،۹].

روش برادفورد به دلیل حساسیت و سادگی امروزه معمول‌ترین روش اندازه‌گیری کمی پروتئین است. اساس این روش بر مبنای توانایی باند شدن اسیدی می‌باشد. به این ترتیب که رنگ کوماسی به گروه‌های قابل یونیزه شدن روی پروتئین نشان می‌دهد که باعث تغییر شکلی در ساختمان پروتئین می‌شود که در نتیجه آن گروه‌های هیدروفوب پروتئین در سطح قرار می‌گیرد که شرایط را برای پیوند غیر اختصاصی و برگشت‌پذیر کوماسی به پروتئین موجب می‌شود. باند شدن پروتئین به رنگ کوماسی فرم آبی رنگ را تثبیت می‌کند و منجر به تغییر رنگی متناسب با میزان پروتئین می‌شود. امروزه روش برادفورد در پلیت خوان‌های اتوماتیک که میزان جذب نوری را در nm ۵۹۵ می‌سنجند به‌کار می‌رود.

با توجه به هزینه بالای تعیین تعداد PMP از طریق میکروذرات (micro bead) و هم‌چنین ضرورت استفاده از دستگاهی پرهزینه مانند فلوسایتومتر، به نظر می‌رسد تعیین غلظت PMP به روش برادفورد روشی ارزان، سریع و به‌صرفه می‌باشد. هم‌چنین در مطالعات PMP، گاه وجود غلظت‌های بالایی از PMP ضروری است. بنابراین در این مطالعه سعی می‌شود که تأثیر دورهای مختلف سانتریفیوژ هم‌چنین اثر فریز کردن در زمان‌های مختلف بر روی غلظت PMP تولیدشده مورد بررسی قرار گیرد. با تغییر فاکتورهای مذکور و جداسازی مقدار بیش‌تر PMP می‌توان از این روش برای تهیه مقادیر بیش‌تر PMP در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار داد.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی انجام شده تجربی و نمونه‌های مورد مطالعه، پلاکت کنسانتره جمع‌آوری شده از اهداکنندگان خون مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون منطقه‌ای و آموزشی استان تهران در زمستان ۱۳۹۳ تهیه شد. به منظور مطالعه تأثیر فاکتورهای مختلف بر جداسازی میکروپارتیکل‌ها، با توجه مطالعات انجام شده، پنج کیسه پلاکت کنسانتره از این پایگاه، تهیه شد. در این مطالعه همه آزمایش‌ها بر روی کیسه‌های پلاکتی کنسانتره سه روزه انجام شد. دلیل انتخاب روز سوم ذخیره، مدت زمان انقضای کیسه پلاکتی می‌باشد (بود: زمان فعل گفته باید گذشته باشه). با توجه به جنس کیسه‌های پلاکتی در ایران، مدت زمان نگه‌داری سه روز می‌باشد [۱۱]. کیسه‌های پلاکتی به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. ابتدا پلاکت‌ها از نظر حجم و پدیده swirling ارزیابی شدند تا در آزمایش اثر گذار نباشند. لازم به ذکر است قبل از دریافت پلاکت‌ها، آزمایش‌های غربالگری ویروسی (HIV (Human Immunodeficiency Virus), HCV (hepatitis C virus), HBV (hepatitis B virus)] روی کیسه‌های پلاکتی، انجام و تکمیل شده بود.

اثر سانتریفیوژ: برای تهیه PRP از دور متفاوت سانتریفیوژ استفاده شد، در پروتکل اول، بعد از جداسازی سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

باقی‌مانده در ۳۰۰g، محتویات کیسه پلاکتی در لوله فالکون ریخته و در ۱۵۰۰ g به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ گردید.

در پروتکل دوم، بعد از جداسازی سلول‌های باقی‌مانده در ۳۰۰g، محتویات کیسه پلاکتی در لوله فالکون ریخته و در ۵۰۰۰ g به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ گردید.

مایع رویی به تیوب جدید انتقال داده شد و میکروپارتیکل‌ها در ۱۶۰۰۰g به مدت ۲۰ min در دمای ۸°c جدا شدند. پس از سه بار شستشو با PBS، غلظت آن‌ها محاسبه شد.

اثر زمان: در مرحله آخر تهیه PMP، دو پروتکل زمانی مختلف بررسی گردید. ابتدا در ۳۰۰ g به مدت ۱۰دقیقه سلول‌های موجود در کیسه جدا شدند. سپس در ۱۷۰۰ g به مدت ۱۰min پلاکت‌ها ته‌نشین شده و سوپ رویی طبق دو پروتکل زمانی متفاوت سانتریفیوژ گردید. در پروتکل زمانی اول، میکروپارتیکل‌ها در ۱۶۰۰۰ g به مدت ۲۰ min جداسازی شدند و در پروتکل زمانی دوم جداسازی در ۱۶۰۰۰g به مدت ۲ min انجام شد. تمامی مراحل در دمای ۸ °c انجام گرفت. پس از سه بار شستشو با PBS، غلظت محاسبه گردید.

اثر فریز: بعد از تهیه PRP در سانتریفیوژ ۳۰۰ g به مدت ۲۰min، لوله‌ها (با حجم ۱۰ cc) در ۸۰°c– فریز شدند. در روزهای صفر تا پنج بعد از تهیه PRP، PRP در دمای آزمایشگاه ذوب شدند و در ۱۶۰۰۰ g به مدت ۲۰ min در دمای ۸ °C سانتریفیوژ شد و رسوب PMP تهیه شد سپس پس از سه بار شستشو با PBS، غلظت آن‌ها محاسبه شد.

غلظت سنجی بعد از انجام سانتریفیوژ رسوب میکروپارتیکل‌های پلاکتی سه بار با PBS شسته شد. سپس غلظت میکروپارتیکل‌های پلاکتی با روش برادفورد تعیین گردید. به این منظور از آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت ۱۰۰۰µg/ml به عنوان استاندارد استفاده شد و از آن شش غلظت ۲۵/۳۱µg/ml، ۵/۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ مختلف تهیه شد و میزان جذب نور (OD) در طول موج nm ۵۹۵ با دستگاه(NanoPhotometer™ Pearl) قرائت گردید. بر اساس منحنی استاندارد، غلظت نمونه‌ها تعیین شد.

بررسی ماهیت میکروپارتیکل‌ها CD41: با توجه به اختصاصیت برای پلاکت‌ها و سهولت دسترسی به محلول‌های آن، انتخاب گردید. برای تایید ماهیت میکروپارتیکل‌ها از منشاء پلاکت از تست فلوسیتومتری استفاده گردید. به این منظور میکروپارتیکل‌ها با ۵ µl از Anti-CD41a Ab FITC (BD bioscience) از کلون HIP8 رنگ‌آمیزی شده و در دمای یخچال (۴°c) و تاریکی، به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس توسط دستگاه Partec Flowcytometer آنالیز و نتایج با نرم‌افزار Flowmax بررسی شد.

قابل ذکر است که برای کلیه تست‌ها، ۵ نمونه پلاکت مورد استفاده قرار گرفت و آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردیدند و کلیه نتایج با نرم‌افزار SPSS version 22 و آزمون‌های آماری Repeated Measures و Paired sample T-test مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

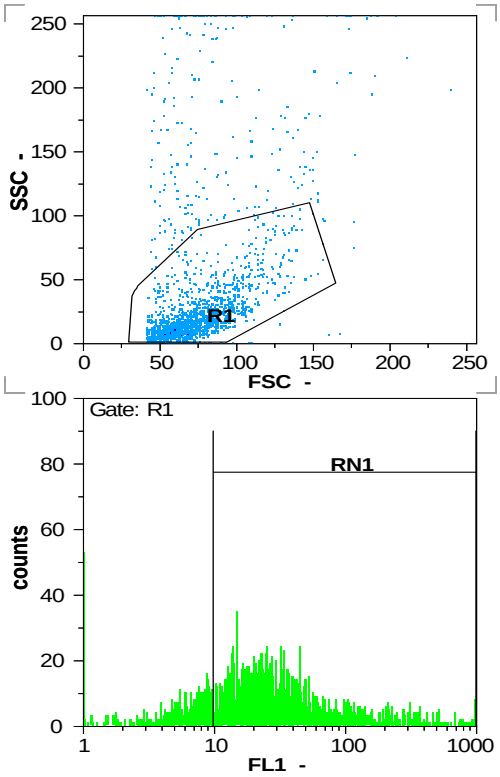
برای تعیین هویت میکروپارتیکل‌ها، آنالیز فلوسیتومتری انجام شد. رنگ‌آمیزی میکروپارتیکل‌ها برای آنتی‌ژن CD41 مثبت بود (۷۵٪) که این امر نشان‌دهنده منشاء پلاکتی آن‌ها است (شکل ۱).

بررسی اثر سانتریفیوژ در بررسی اثر سانتریفیوژ بر مقدار میکروپارتیکل‌های تولیدشده، نتایج نشان داد که دور سانتریفیوژ پایین در تهیه PRP باعث افزایش غلظت میکروپارتیکل‌ها شده و نتایج از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p value<۰/۰۵). به عبارت دیگر کاهش دور سانتریفیوژ در تهیه PRP باعث افزایش میکروپارتیکل‌های به دست آمده می‌شود. مقادیر در شکل ۲ نشان داره شده‌اند.

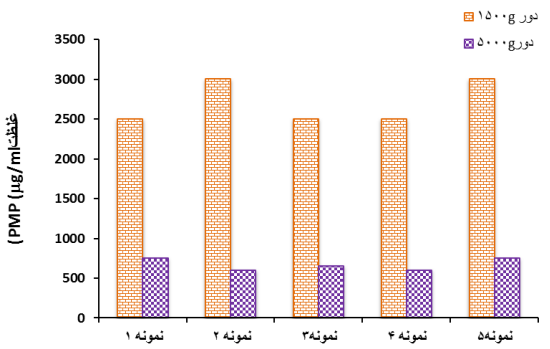
در بررسی اثر زمان سانتریفیوژ نشان داده شد که میزان تولید میکروپارتیکل‌ها از ۱۰cc PRP، بین زمان‌های ۲min با ۲۰min تفاوت معناداری وجود نداشت (p value<۰/۰۵). شکل ۳ بیانگر این موضوع می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



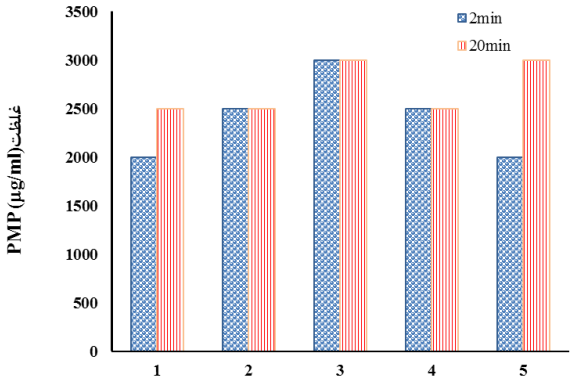
شکل ۱. آنالیز فلوسیتومتری میکروپارتیکل‌ها برای CD41، میکروپارتیکل‌ها ۷۵ درصد برای این مارکر مثبت بودند. A: گراف نمایشگر پراکندگی سلول می باشد که گیت R1 به عنوان جمعیت اصلی انتخاب گردید. B: گراف نمایشگر اتصال آنتی‌بادی علیه CD41 کونژوگه با FITC.



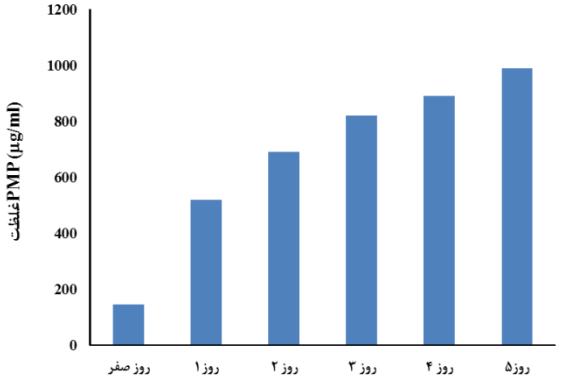
شکل ۲. اثر دور سانتریفیوژ جهت تولید PRP ومیزان غلظت PMP: با کاهش سانتریفیوژ در مرحله تولید PRP از g۵۰۰۰ به g۱۵۰۰، غلظت PMP افزایش یافت ($p \leq 0.05$).

برای بررسی اثر فریز در تولید PMP در روزهای مختلف، در مقایسه با روز صفر آزمایش، میزان میکروپارتیکل‌ها در تمام روزها افزایش یافته بود و این افزایش معنی‌دار بود. نتایج بررسی اثر روزهای مختلف فریزکردن بر مقدار PMP تولیدی در شکل ۴ نشان داده شده است.

البته شایان ذکر است با توجه به معنادار نبودن روند افزایشی از روز دوم به بعد، استنتاج شد که فریز کردن در همه روزها باعث افزایش تولید میکروپارتیکل شد اما بین افزایش مقدار پارتیکل و تعداد روزها رابطه مستقیمی وجود نداشت.



شکل ۳. اثر تغییر زمان در مرحله جداسازی PMP بر غلظت آن‌ها، با کاهش زمان از ۲۰ دقیقه به دو دقیقه تفاوت معناداری در غلظت PMPs مشاهده نشد ($p \leq 0.05$).



شکل ۴. اثر فریز در روزهای مختلف بر غلظت PMP، فریز در تمامی روزها نسبت به روز صفرافزایش معنادار را نشان داد.($p \leq 0.05$)

بحث و نتیجه‌گیری

در چند سال اخیر میکروپارتیکل‌ها مورد توجه محققین بسیاری قرار گرفته‌اند ولی به دلیل تنوع زیاد روش‌های تولیدی، چالش‌هایی در این زمینه وجود دارد که موجب عدم هماهنگی بین مطالعات گردیده است.

در این مطالعه برای تهیه میکروپارتیکل‌ها، در پروتکل اول از سانتریفیوژ در تهیه PRP ۱۵۰۰g استفاده گردید. در مطالعه اسماعیلی و همکاران هم‌چنین shah نتایج مشابه مطالعه حاضر می‌باشد که میزان PMP تولید شده PRP حاصل از دور

www.SID.ir

Archive of SID

g ۱۵۰۰ با تفاوت معناداری بیش‌تر از این میزان در دور g ۵۰۰۰ گزارش شده است [۷].

در بررسی اثر زمان سانتریفیوژدر تهیه میکروپارتیکل‌ها، از دو زمان ۲ دقیقه و ۲۰ دقیقه استفاده شد، ولی تفاوت معناداری بین دو زمان ذکر شده مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که توسط Robert انجام شد زمان ۲ دقیقه لحاظ گردید [۱۲]. در مطالعه دیگر از زمان یک ساعت با دور g ۵۰۰۰۰ استفاده شده است [۱۳]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از زمان کوتاه‌تر 2min با حجم ۱۰ میلی‌لیتر از PRP روشی ساده‌تر و عملی‌تر به نظر می‌رسد و برای حجم‌های بالاتر PRP نیاز به مطالعات بیش‌تر است.

به منظور بررسی اثر فریز در تولید میکروپارتیکل‌ها، پلاکت‌ها در لوله‌های فالکون، با حجم ۱۰cc در ۸۰°c- به مدت ۵ روز فریز شدند و در روزهای صفر تا پنج غلظت میکروپارتیکل‌های تعیین شدند. در تمامی تست‌ها میزان غلظت میکروپارتیکل‌های نسبت به روز صفر افزایش معنی‌دار داشت. Nielsen در تحقیق خود برای تهیه میکروپارتیکل‌های از فریز در ۸۰ °c- استفاده کرد [۱۰]. Chandler در سال ۲۰۱۳ برای تولید PMP از فریز استفاده کرد و در این مطالعه افزایش ۲۰ برابری PMP مشاهده شد ولی پروفایل بیان آنتی‌ژنی آن‌ها متفاوت بود [۱۴].

در این مطالعه، برای سنجش غلظت میکروپارتیکل‌ها از روش برادفورد استفاده شد که روشی سریع و ارزان قیمت می‌باشد که می‌توان از آن در اکثر آزمایشگاه‌ها استفاده نمود. در این مطالعه برای شناسایی میکروپارتیکل‌های تهیه شده از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. برای تایید منشاء پلاکتی PMP از آنتی‌بادی CD41 استفاده شد که تنها در رده پلاکتی و مگاکاریوسیت‌ها دارای بیان سطحی می‌باشد. تفاوت در ترکیب سطحی PMP بستگی به نوع مطالعه و روش تولید می‌باشد. هدف از این مطالعه تهیه مقادیر بیش‌تر PMP از پلاکت با روش آسان و کم‌هزینه بود بنابراین بررسی دیگر آنتی‌ژن‌های در ترکیب سطحی PMP مورد بررسی قرار نگرفت. البته باید توجه نمود که تفاوت ترکیب سطحی PMP بنا بر روش تولید متفاوت خواهد بود. به‌عنوان مثال در مطالعه در سال ۲۰۰۹ نشان داده شد، طی فریز، غشا پلاکت پاره شده و مولکول اکتین بروز می‌یابد [۸]. در مطالعه‌ای دیگر که انکسین V مورد بررسی قرار گرفته بود، میزان بروز آنکسین V در نمونه‌ها بعد از ذخیره طولانی در فریز افزایش داشت [۱۵]. در مطالعه Chandler نیز تغییر بروز آنتی‌ژنی بر سطح PMP مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده بود سانتریفیوژ تک مرحله برای تهیه پلاسمای تهی از پلاکت کافی نیست و موجب افزایش بیان آنکسین V به میزان ۶۰٪ شده است [۱۴]. بنابراین در تهیه PMP باید هدف انجام آزمایش در نظر گرفته شود و بر اساس آن روش صحیح انتخاب گردد. تغییرات انواع آنتی‌ژن‌های موجود بر سطح میکروپارتیکل پلاکتی در این زمینه سودمند خواهد بود.

اثر دور سانتریفیوژ، زمان و فریز در روزهای مختلف بر میزان تولید PMP بررسی شد. نتایج نشان داد که کاهش دور سانتریفیوژ در مرحله تولید PRP باعث افزایش به دست آمدن PMP می‌شود اما کاهش زمان سانتریفیوژ در مرحله تهیه PMP باعث کاهش معنی‌دار غلظت PMP نمی‌گردد. بنابرین استفاده از زمان کوتاه‌تر روشی عملی‌تر به نظر می‌رسد. هم‌چنین همه پلاکت‌های فریز شده نسبت به روز صفر، مقدار PMP بیش‌تری را نشان دادند. البته باید تغییرات در آنتی‌ژن‌های سطحی مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بدین وسیله از مرکز تحقیقات موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون برای حمایت مالی این پایان‌نامه تشکر می‌گردد.

منابع

[1] Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Rev 2007; 21: 157-71.

www.SID.ir

Archive of SID

[2] Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. Thromb Haemost 2009; 101: 439-51.

[3] Kowalska MA, Ratajczak J, Hoxie J, Brass LF, Gewirtz A, Poncz M, Ratajczak MZ. Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. Br J Haematol 1999; 104: 220-9.

[4] Trummer A, De Rop C, Tiede A, Ganser A, Eisert R. Isotype controls in phenotyping and quantification of microparticles: A major source of error and how to evade it. Thromb Res 2008; 122: 691-700.

[5] Yin W, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles. Platelets 2008; 19: 225-233.

[6] Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, Turner AR, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. Blood 2001; 98: 3143-3149.

[7] Esmaili MA, Yari F, Sharifi Z, Nikougoftar M, Fadaei R. Effects of platelet microparticles on the activation of B cells. Modares J Med Sci Pathobiol 2013; 15: 1-10. (Persian).

[8] Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, Hansson M, Jörneskog G, Hultenby K, Wallén H. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. Thromb Res 2010; 125: e110-e116.

[9] Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Siedlar M, Szatanek R. Application of Flow Cytometry in the Studies of Microparticles: INTECH Open Access Publisher; 2012.

[10] Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. J Extracell Vesicles 2014; 3.

[11] Roback JD. Technical Manual: AMER ASSN OF BLOOD BANKS; 2014.

[12] Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? J Thromb Haemost 2009; 7: 190-197.

[13] Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Weglarczyk K, Szatanek R, Szaflarska A, Siedlar M, Zembala M. Tumour-derived microvesicles (TMV) mimic the effect of tumour cells on monocyte subpopulations. Anticancer Res 2010; 30: 3515-3519.

[14] Chandler WL. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. Blood Coagul Fibrinolysis 2013; 24: 125-132.

[15] Shah MD, Bergeron AL, Dong J-F, López JA. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. Platelets 2008; 19: 365-372.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of speed and time of centrifugation and time of freezing on the amount of produced microparticles from concentrates platelet

Tahere manoochehrabadi (M.Sc)[1], Zohreh Sharifi (Ph.D)[*1], Fatemeh yari (Ph.D)[1], EhlamRezvani Broujeni (M.Sc)[2], Hamideh Mirshafie (Ph.D)[2], Mahinnikougoftar Zarif (Ph.D)[1], Ghasem Hasannejad (M.Sc)[1]

1 - High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Research Center, Iran blood Transfusion Organization, Tehran, Iran

2 – Shahid Beheshti University, Faculty of Biological Science, Department of Microbiology, Tehran, Iran

(Received: 7 May 2015; Accepted: 6 Oct 215)

Introduction*:* The main method of separating platelet microparticles (PMP) is based on the centrifugation speed and time. Due to the high cost of determining the number of PMP via micro-particles (micro bead) and also the necessity of using an expensive device such as a flow cytometer, it seems that Bradford method would be rather an inexpensive, fast and efficient way to determine the concentration of PMP. Therefore, in this study the effect of different factors, such as speed and time of centrifugation and time of freezing on the concentration of PMP in the platelet concentrates bags was studied.

Materials and Methods*:* We studied two different speeds of centrifugation for separating PRP. In the first protocol for preparation of PRP, the platelet bags were centrifuged at 1500g for 15min and in the second protocol; they were centrifuged at 5000g for the same duration. To evaluate the effect of time, microparticles were separated in 16000g for 20 and 2 min. To determine the concentration of PMP, Bradford method was used. To evaluation the effect of freezing, the PRP was prepared at 300g for 20 min, and then it was freezed in -80˚c for five days. Flow cytometery analysis was performed for microparticles identification.

Results*:* PMP concentrates with the 1500g centrifugation speed showed higher concentration ($P < 0.05$). There was not any significant difference in concentrations of PMPs in relation to the time of centrifugation (2 and 20 min) ($P < 0.05$). Freezing the platelet bags led to higher PMP concentration in compare to the first day of experiment. Flow cytometry analysis showed that microparticles had platelet marker CD41, which represented their origin.

Conclusion*:* The result of this study showed that the reduction of centrifugation speed could produce higher levels of the microparticles. In addition, the time of separation in the final stage had no significant effect on PMP isolation. Freezing could lead to higher PMP concentration.

Keywords*:* Blood Platelets, Centrifugation, Freezing, Cell-Derived Microparticles

* Corresponding author. Tel: +98 21 82052233

z.sharifi@ibto.ir

www.SID.ir