Archive of SID

Journal of North Khorasan Medical Sciences
No 45, Volume 12, Issue 1

Research Article

Evaluation of Effect of Plasmas Prepared from Packed Red Blood Cells at Different Weeks on Production of Nitric Oxide (NO) and Malondialdehyde (MDA) from Peripheral Blood Mononuclear Cells in Vitro

Allireza Abbaspour [1], Saeed Barzegar [2], Hasan Namdar Ahmadabad [3,*], Shima Shekari [4], Hamid Soorgi [5]

[1] Assistant Professor of Medical Biochemistry, Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[2] Instructor of Hematology, Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Assistant Professor of Medical Immunology, Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] Assistant Professor of Pediatrics, Pediatric Department, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[5] Assistant Professor of Dermatology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
*** Corresponding author:** Hasan Namdar Ahmadabad, Department of Pathobiology and Labratory Sciences, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: namdar360@gmail.com

DOI: 10.29252/nkjmd-12014

How to Cite this Article:
Abbaspour A, Barzegar S, Namdar Ahmadabad H, Shekari Sh, Soorgi H. Evaluation of Effect of Plasmas Prepared from Packed Red Blood Cells at Different Weeks on Production of Nitric Oxide (NO) and Malondialdehyde (MDA) from Peripheral Blood Mononuclear Cells in Vitro. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2020;**12**(1):27-33. DOI: 10.29252/nkjms-12014

Received: 28 Jan 2020
Accepted: 06 May 2020
Keywords:
Blood Transfusion
Malondialdehyde
Nitric Oxide
Plasma
Peripheral Blood Mononuclear Cell
© 2020 North Khorasan Medical Sciences

Abstract

Introduction: In present study, we evaluated the effect of plasma collected from packed red blood cells (PRBCs) at various weeks after donation on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Methods: In this experimental study, plasma prepared from twenty PRBCs in the first, second, fourth, and fifth weeks after donation. PBMCs were also isolated from healthy donors and treated with different concentrations of prepared plasma in vitro. NO and MDA levels were measured in culture supernatant using Griess reaction and thiobarbituric acid method, respectively and cell activity was evaluated using MTT assay. GraphPad Prism (version 5) software was used for statistical analysis (repeated measure) of the data. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results: Our results indicated that plasma prepared from PRBCs during the early weeks increases the activity of PBMCs and enhance NO production. We also found that these plasmas have various effects on concentration of MDA released from PBMCs depending on time and concentration.

Conclusions: We concluded that plasma of PRBCs can have immunostimulatory or immunosuppressive effects on PBMCs, depending on the concentration and duration of blood bag storage.

Copyright *© 2020 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

بررسی اثر پلاسماهای تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته‌های مختلف بر میزان تولید مالون دی آلدهید (MDA) و نیتریک اکساید (NO) از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در شرایط آزمایشگاهی

علیرضا عباسپور [۱]، سعید برزگر [۲]، حسن نامدار احمدآباد [۳*]، شیما شکری [۴]، حمید سورگی [۴]

[۱] استادیار بیوشمی پزشکی، گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] مربی خون شناسی، گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] استادیار ایمنی شناسی پزشکی، گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] استادیار کودکان، گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۵] استادیار بیماری‌های پوست، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** حسن نامدار احمدآباد، گروه علوم آزمایشگاهی و پاتوبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: Namdar360@gmail.com

DOI: 10.29252/nkjms-12014

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۷
واژگان کلیدی:
انتقال خون
مالون دی آلدهید
نیتریک اکساید
پلاسما
سلول تک‌هسته‌ای خون محیطی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی محفوظ است.

چکیده

مقدمه: ما در مطالعه حاضر اثر پلاسمای جمع آوری شده از کیسه‌های خون فشرده در هفته‌های مختلف پس از اهدا را بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) مورد بررسی قرار دادیم.

روش کار: در این مطالعه تجربی پلاسما از ۲۰ کیسه خون فشرده طی هفته‌های اول، دوم، چهارم و پنجم پس از اهدا تهیه شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نیز از دیگر دهندگان سالم جدا شده و با غلظت‌های مختلف پلاسمای تهیه شده در آزمایشگاه تیمار شدند. میزان نیتریک اکساید و مالون دی آلدهید در مایع رویی کشت به ترتیب با استفاده از واکنش‌های گریس و اسید تیوباربیوتوریک تعیین گردید و میزان فعالیت سلول‌ها با استفاده از روش MTT مشخص شد. از نرم افزار گراف پد پریزم نسخه ۵ برای آنالیزآماری اطلاعات استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که پلاسماهای تهیه شده از کیسه‌های گلبول قرمز فشرده در طی هفته‌های ابتدایی میزان فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و تولید نیتریک اکساید از آنها را افزایش می‌دهد. ما همچنین دریافتیم پلاسما بسته به زمان تهیه و غلظت استفاده شده اثرات متفاوتی بر رهاسازی مالون دی آلدهید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی دارد.

نتیجه گیری: ما دریافتیم که پلاسمای تهیه شده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بسته به غلظت و طول مدت نگهداری کیسه خون می‌توانند اثرات مهاری یا تحریک کنندگی ایمنی بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی داشته باشند.

مقدمه

امروزه انتقال خون به عنوان بخش مهمی از فعالیت‌های بالینی روزانه از جمله جراحی‌های مختلف، تروما، خون ریزی‌های گوارشی و زایمان به منظور جایگزینی خون از دست رفته کاربرد دارد [۱]. در کشورهای پیشرفته حدود یک درصد جمعیت به طور سالانه نیازمند تزریق خون هستند که در این میان تزریق گلبول‌های قرمز بیشترین میزان مصرف را دارد [۲]. در اکثر بیماران حتی در عدم حضور دیگر فراورده‌های خونی، گلبول قرمز به عنوان پرکاربردترین فراورده می‌تواند سبب نجات جان افراد شود و این کار بجز از طریق نگهداری گلبول‌های قرمز میسر نیست [۳]. در گذشته خون به صورت کامل و تنها با استفاده از مواد ضدانعقاد جمع آوری می‌شد که این امر سبب نگهداری کوتاه مدت و هدر رفتن خون اهدایی افراد داوطلب می‌شد [۴] اما امروزه با استفاده از مواد نگهدارنده، کیسه‌های مخصوص و امکان جداسازی اجزای خون، نگهداری آن نسبت به گذشته طولانی‌تر شده است و می‌توان آن را به مدت حداکثر ۴۲ روز در ۲ تا ۶ درجه سانتیگراد نگهداری کرد [۱]. نظر به اینکه به محض گرفتن خون از فرد اهدا کننده روند تخریب اجزای آن آغاز می‌شود [۵]، سلامت و اثربخشی آن به عنوان اولین هدف در نگهداری و انتقال خون مطرح می‌باشد. از این جهت همواره بهترین فاصله زمانی بین اهدا و انتقال فراورده مورد بحث است. نگهداری خون در شرایط خارج از بدن می‌تواند فراورده خونی را دستخوش تغییراتی کند که آنرا فاقد پتانسیل‌های کافی برای تزریق می‌کند. این تغییرات

Copyright © 2020 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

در یک فرایند پیچیده سبب ایجاد "عوارض ذخیره سازی" خون می شود [۶].

یکی از عوارض ذخیره سازی خون افزایش تدریجی استرس اکسیداتیو در کیسه‌های خون می‌باشد که در نتیجه سبب عدم تعادل بین واسطه‌های فعال اکسیژنی و آنتی اکسیدانی می‌شود. ما در مطالعه قبلی نشان دادیم با افزایش هفته‌های نگه داری کیسه‌های خون شاهد کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش میزان رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش میزان استرس اکسیداتیو در کیسه‌های خون هستیم [۷].

یکی دیگر از عوارض شناخته شده در هنگام ذخیره سازی خون اثرات مهارکنندگی سیستم ایمنی در دریافت کنندگان خون است. بهبود بقای بافت پیوندی کلیه، افزایش شانس عود مجدد سرطان، کاهش شدت بیماری‌های خودایمن و ریسک افزایش یافته عفونت از عوارض شناخته مرتبط با فعالیت‌های مهارکنندگی ایمنی ناشی از انتقال خون آلوژنیک است [۸, ۹]. تاکنون مطالعات محدودی در زمینه شناخت مکانیسم‌های ایمنومدولاتوری کیسه‌های خون بر گیرندگان خون صورت گرفته است که القای سلول‌های T تنظیمی بدون دخالت سایتوکاین ها یکی از این مکانیسم‌هایی است که در سال‌های اخیر معرفی شده است [۱۰].

در توجیه اثرات مهارکنندگی ایمنی کیسه‌های خون تزریقی در گیرندگان، ما پیش بینی نمودیم احتمالاً رادیکال‌های آزاد موجود در کیسه‌های خون بتوانند از طریق تخریب اکسیداسیونی اسیدهای چرب موجود در غشای سلول‌های ایمنی و تأثیر بر فعالیت عملکردی آنها سبب این اثر مهارکنندگی گردند. برای تأیید این پیش بینی ما در این مطالعه برای اولین بار اثر پلاسمای استخراج شده از کیسه‌های خون طی هفته‌های متوالی را بر میزان فعالیت سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی مورد بررسی قرار دادیم. در ضمن اثر این پلاسماها بر تولید مالون دی آلدهید-ترکیبی که تحت شرایط استرس اکسیداتیو و بدنبال واکنش رادیکال‌های آزاد با اسیدهای چرب موجود در غشاهای سلولی تولید می‌شود و نشانه تخریب سلولی است [۱۱] و همچنین نیتریک اکساید- یک پیام‌رسان رادیکال آزاد که بدنبال تحریک سلول‌های مختلف از ال-آرژنین تولید می‌شود [۱۲] را مورد بررسی قرار دادیم.

روش کار

در این مطالعه تجربی افراد مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون شهرستان بجنورد به صورت تصادفی انتخاب و پس از تکمیل فرم رضایت آگاهانه از آنها کیسه‌های خون تهیه گردید. حجم نمونه مطالعه حاضر مطابق فرمول زیر با احتساب z = ۱,۹۶ می‌باشد و دقت d= ۰,۰۵ و انحراف معیار s = ۰,۱ محاسبه گردید، که مشابه مطالعه بلوزوف و همکارانش [۶] حجم نمونه ۱۵ بود که با احتساب ریزش جمعیت ۲۰ نفر اهدا کننده خون انتخاب شدند.

$$n = \frac{z^2 s^2}{d^2}$$

این افراد فاقد سابقه بیماری‌های قلبی عروقی، خودایمنی، سرطان، بیماری‌های متابولیک، و آلرژیک بودند و داروهای خاصی نیز مصرف نمی‌کردند. همچنین کلیه افراد از نظر شرایط اهدای خون و سلامت عمومی توسط پزشک انتقال خون به صورت فیزیکی و پرسشنامه سازمان انتقال خون مورد بررسی قرار می‌گیرند. کیسه‌های خون اهدایی از نظر وجود وجود عفونت‌های هپاتیت B، هپاتیت C، HIV و سیفلیس منفی بودند.

پس از خون گیری و جداسازی فراورده، کیسه‌های خون تهیه شده همگی از جنس پلی وینیل کلراید و حاوی گلبول قرمز متراکم بودند. این کیسه‌ها برای مدت ۳۵ روز در شرایط استاندارد بانک خون (دمای ۶-۱ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. با احتساب روز اول از هر کیسه خون ۴ نوبت نمونه گیری در شرایط استریل به میزان ۱۵ سی سی طی هفته‌های اول، دوم، چهارم، پنجم انجام شد. کیسه‌های خون پس از هر بار نمونه گیری و با رعایت زمان ماندگاری در دمای محیط (کمتر از ۳۰ دقیقه) مجدداً در شرایط نگهداری در دمای بانک خون قرار گرفتند. نمونه‌های جمع آوری شده در لوله‌های استریل هر مرحله با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و در نهایت پلاسما جدا و تا زمان آزمایش‌های بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از افراد داوطلب سالم بدون سابقه بیماری خاص و یا عدم مصرف طولانی مدت داروی خاص با رضایت آگاهانه استفاده گردید. ابتدا نمونه خون توسط سرنگ آغشته به هپارین استریل گرفته و در داخل لوله‌های استریل جمع آوری شد و با استفاده از محیط گرادیان فایکول و بر اساس روشی که توسط دارایی و همکاران توصیف شده بود [۱۳] سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی جدا شدند. سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده با استفاده از لام نئوبار شمارش شده، و با فراوانی ۱ میلیون سلول در محیط کشت کامل RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر، و استرپتومایسین ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر حل و با حجم ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت های کشت ۹۶ خانه‌ای توزیع شدند. درصدهای مختلفی از پلاسمای استخراج شده از کیسه‌های خون (۵، ۱۰، و ۲۰ درصد) به طور مجزا به چاهک‌های مختلف افزوده شده و به مدت ۷۲ ساعت در حضور میتوژن های PHA (فیتوهماگلوتینین) و LPS (لیپو پلی ساکارید) کشت داده شدند. سلول‌های تک هسته‌ای تحریک شده با PHA و LPS بدون افزودن پلاسما به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تیمار شده با سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از طی زمان انکوباسیون، مایع رویی کشت سلولی جمع آوری و برای آنالیزهای بعدی در ۷۰- درجه سانتی گراد فریز شد. مطابق روشی که توسط بردبار و همکاران توصیف شده بود [۱۴] میزان شاخص تحریکی سلول‌های تک هسته‌ای با تیمارهای مختلف با استفاده از آزمایش MTT و بر اساس فرمول: (میزان متوسط جذب نوری سلول‌های تیمار شده با درصدهای مختلف پلاسما ÷ میزان متوسط جذب نوری سلول‌های تیمار شده با بافر فسفات سالین) محاسبه گردید. اندازه گیری مالون دی آلدهید پلاسمایی با استفاده از کیت (طب پژوهان رازی، ایران) صورت گرفت. اساس این کیت روش رنگ سنجی و بر اساس واکنش با تیوباربیتوریک اسید و مقایسه با منحنی استاندارد بود. برای اندازه گیری نیتریک اکساید نیز از کیت (سیب زیست فن، ایران) استفاده شد. اساس این کیت نیز روش رنگ سنجی و بر اساس واکنش گریس و مقایسه با منحنی استاندارد بود. برای حذف اثر زمینه‌ای مالون دی آلدهید و نیتریک اکساید موجود در پلاسماهای

www.SID.ir

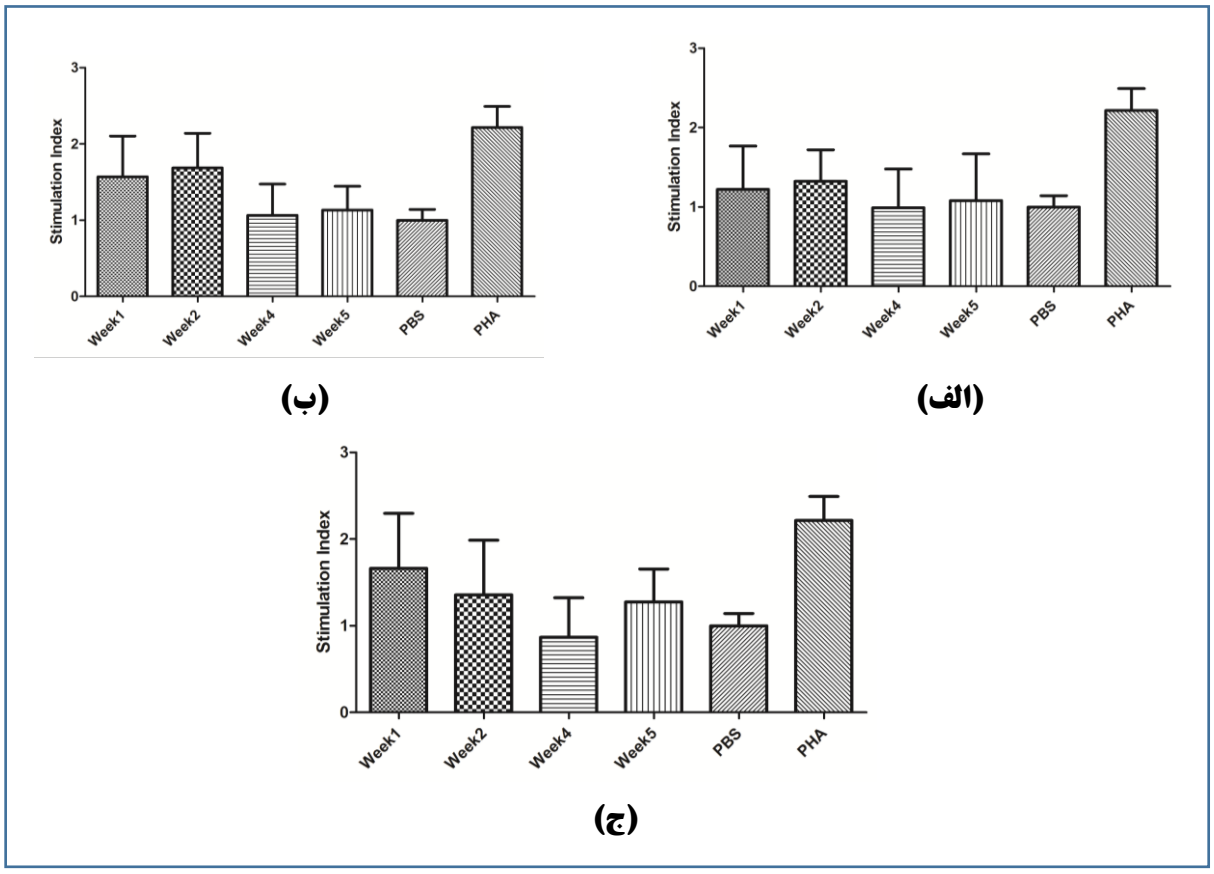
Archive of SID

کیسه خون، از چاهک‌های حاوی محیط کشت کامل RPMI-1640 که به آنها پلاسماهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد افزوده شد، استفاده گردید. از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۵ برای آنالیز آماری داده‌ها استفاده شد. اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آزمون با آزمون‌های آماری Repeated Measure مورد تجزیه تحیل قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شدند. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

محدوده سنی افراد داوطلبی که کیسه خون از آنها تهیه شد بین ۱۸ تا ۵۷ سال و با میانگین سنی ۳۵/۵ سال بودند. این در حالی بود که دامنه سنی افراد اهدا کننده خون برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای بین ۳۵ - ۱۸ و با میانگین سنی ۲۶/۵ بودند. در ضمن تمامی افراد انتخاب شده دارای گروه خونی O و از نظر نسبت وزن به مجذور قد (BMI) در محدوده طبیعی دارای اهدای خون مستمر بودند.

نتایج آزمایش MTT نشان داد که پلاسماهای تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته‌های اول و دوم اثر تحریکی بیشتری از پلاسمای هفته‌های سوم و چهارم بر فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای دارند. بررسی های بیشتر نشان داد افزودن پلاسمای کیسه‌های خون هفته‌های اول و دوم با غلظت ۱۰ درصد بیشترین اثر تحریکی و پلاسمای هفته چهارم با درصدهای ۵ و ۲۰ درصد کمترین اثر تحریکی را بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی داشتند (شکل ۱).



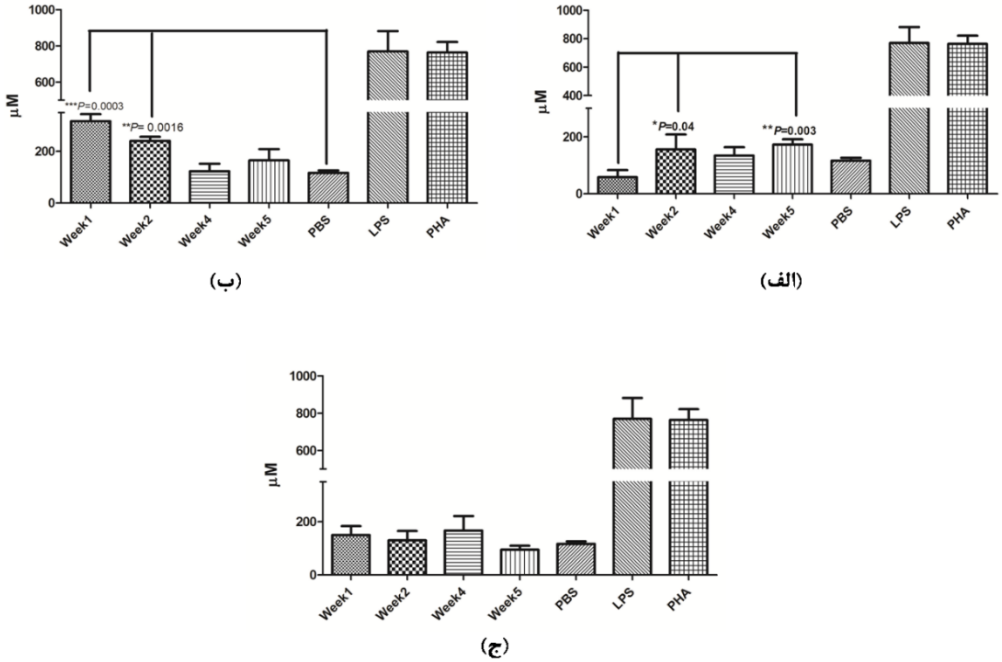
شکل ۱. اثر پلاسماهای با غلظت‌های ۵ درصد (الف)، ۱۰ درصد (ب)، و ۲۰ درصد (ج) تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته مختلف بر میزان فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از آزمون MTT. هفته اول: روز اول خونگیری، هفته دوم: روز هفتم پس از خونگیری، هفته چهارم: روز بیست و یکم بعد از خونگیری، هفته پنجم: روز بیست و هشتم بعد از خونگیری. LPS: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با لیپوپلی ساکارید،PHA : سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با فیتوهماگلوتینین، PBS: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با سرم فیزیولوژی. Stimulation Index: میزان متوسط OD ماکروفاژهای تیمار شده با درصدهای مختلف پلاسما ÷ میزان متوسط OD سلول‌های تیمار شده با بافر فسفات سالین، *P < ۰/۰۵، **P < ۰/۰۱، ***P < ۰/۰۰۱.

در مقایسه اثر پلاسمای هفته‌های مختلف با درصدهای مختلف بر تولید مالون دی آلدهید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، آنالیزهای آماری نشان داد افزودن پلاسماهای مختلف تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته‌های اول، دوم، چهارم و پنجم با غلظت‌های ۵ درصد به محیط کشت سلول‌های تک هسته‌ای بصورت معناداری اثرات متفاوتی بر القای تولید مالون دی آلدهید از این سلول‌ها دارد (P < ۰/۰۵). در مقایسه با سلول‌های تک هسته‌ای که با سرم فیزیولوژی تیمار شده بودند، افزودن پلاسمای هفته پنجم با غلظت ۵ درصد بیشترین میزان را در القای تولید مالون دی آلدهید (۱۹/۰۱ ± ۱۷۲/۷ میکرومولار در میلی لیتر) و افزودن پلاسمای هفته اول با غلظت ۵ درصد کمترین اثر را بر القای تولید این ترکیب (۲۴/۵۱ ± ۵۸/۴۹ میکرومولار در میلی لیتر) داشت. در مورد اثر غلظت ۱۰ درصد پلاسما نیز نتایج نشان داد تفاوت معناداری در میزان تولید مالون دی آلدهید از سلول‌های تک هسته‌ای طی تیمار با پلاسماهای هفته‌های مختلف بخصوص پلاسماهای هفته اول و دوم مشاهده می‌شود (P < ۰/۰۵). افزودن پلاسماهای هفته‌های مختلف به استثنای هفته پنجم با غلظت ۲۰

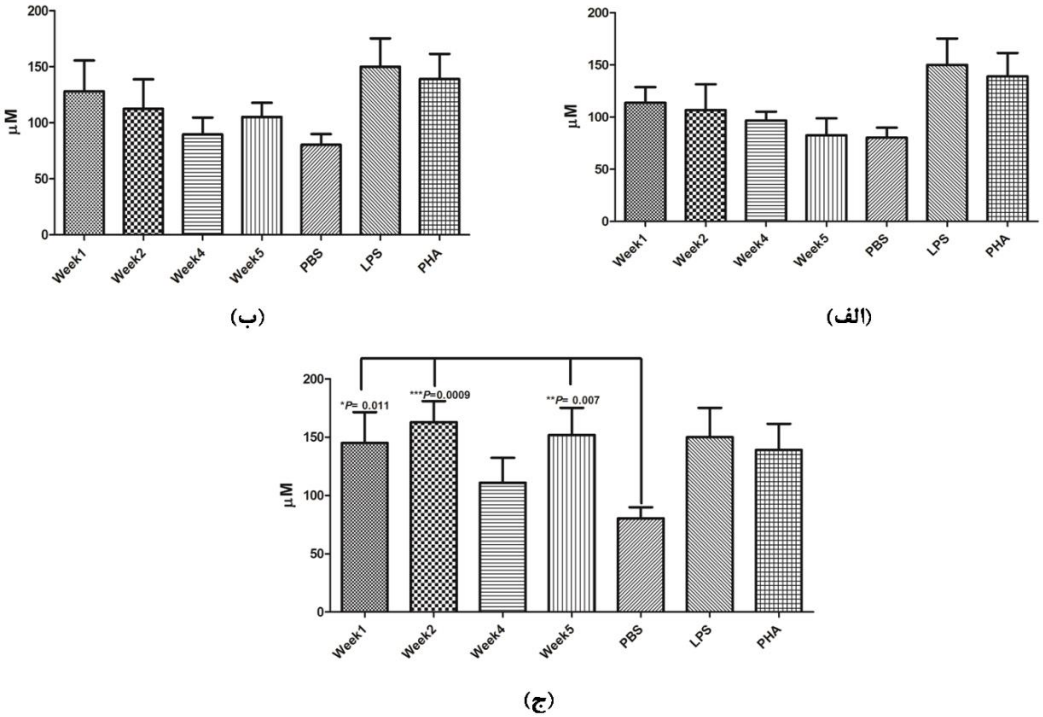
www.SID.ir

Archive of SID

درصد به محیط کشت سلول‌های تک هسته‌ای منجر به افزایش تولید مالون دی آلدهید می‌گردد، هر چند در مقایسه به کنترل تفاوت آماری معنادار مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۲). مقایسه کلی نشان داد بیشترین میزان تولید مالون دی آلدهید با افزودن پلاسمای هفته اول با غلظت ۱۰ درصد (۲۷/۴۷ ± ۳۱۶/۴ میکرومولار در میلی لیتر) و کمترین میزان القای تولید مالون دی آلدهید ناشی از افزودن پلاسمای هفته اول با غلظت ۵ درصد (۲۴/۵۱ ± ۵۸/۴۹ میکرومولار در میلی لیتر) مشاهده می‌شود.



شکل ۲. اثر پلاسماهای با غلظت‌های ۵ درصد (الف)، ۱۰ درصد (ب)، و ۲۰ درصد (ج) تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته مختلف بر میزان تولید مالون دی آلدهید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی. هفته اول: روز اول خونگیری، هفته دوم: روز هفتم پس از خونگیری، هفته چهارم: روز بیست و یکم بعد از خونگیری، هفته پنجم: روز بیست و هشتم بعد از خونگیری. LPS: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با لیپوپلی ساکارید،PHA: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با فیتوهماگلوتینین، PBS: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با سرم فیزیولوژی، *P < ۰/۰۵، **P < ۰/۰۱، ***P < ۰/۰۰۱.



شکل ۳. اثر پلاسماهای با غلظت‌های ۵ درصد (الف)، ۱۰ درصد (ب)، و ۲۰ درصد (ج) تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته مختلف بر میزان تولید نیتریک اکساید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی. هفته اول: روز اول خونگیری، هفته دوم: روز هفتم پس از خونگیری، هفته چهارم: روز بیست و یکم بعد از خونگیری، هفته پنجم: روز بیست و هشتم بعد از خونگیری. LPS: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با لیپوپلی ساکارید،PHA: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با فیتوهماگلوتینین، PBS: سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با سرم فیزیولوژی، *P < ۰/۰۵، **P < ۰/۰۱، ***P < ۰/۰۰۱.

www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی اثر پلاسماهای تهیه شده از کیسه خون طی هفته‌های مختلف با غلظت ۵ و ۱۰ درصد بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مشخص شدکه هر چند میزان تولید نیتریک اکساید از سلول‌های تک هسته‌ای تیمار شده با غلظت ۵ و ۱۰ درصد از پلاسماهای مختلف (بخصوص پلاسمای مرتبط با هفته‌های اول و دوم) در مقایسه با سلول‌های تک هسته‌ای که با سرم فیزیولوژی تیمار شده بودند، افزایش پیدا می‌کند، اما آنالیزهای آماری تفاوت معناداری را نشان نداد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۳). در بررسی اثر غلظت ۲۰ درصد پلاسماهای تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته‌های مختلف نتایج نشان داد افزودن پلاسمای هفته‌های مختلف منجر به افزایش تولید نیتریک اکساید از سلول‌های تک هسته‌ای می‌گردد، آنالیزهای آماری حاکی از وجود تفاوت آماری معنادار بین گروه کنترل با گروه تیمار شده با پلاسماهای هفته اول، دوم و پنجم، (بجز هفته چهارم) بود. ($P < ۰/۰۵$).

بحث

نگهداری خون‌های اهدایی در شرایط خارج بدن سبب تغییرات زیادی در آن‌ها می‌شود. بخشی زیادی از مطالعات بر اثر مدت زمان نگه داری خون بر ریخت شناسی و عملکرد گلبول‌های قرمز متمرکز شده است و بسیاری از عوارض ناشی از انتقال خون را مرتبط با این تغییرات عنوان نموده‌اند [۱۵]. اما تاکنون مطالعات محدودی در زمینه اثرات پلاسماهای موجود در کیسه‌های خون بر عوارض ناشی از انتقال خون صورت گرفته است. ما در در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر پلاسماهای کیسه‌های خون طی هفته‌های مختلف نگه داری بر سلول‌های تک هسته‌ای خون پرداختیم. نتایج ما نشان داد پلاسماهای موجود در کیسه‌های خون طی هفته‌های ابتدایی سبب افزایش فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و افزایش تولید نیتریک اکساید از آن‌ها می‌گردد. در بررسی تولید مالون دی آلدهید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نیز نتایج نشان داد پلاسماهای موجود در کیسه‌های خون سبب پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول‌های تک هسته‌ای و آزادسازی مالون دی آلدهید می‌گردند.

در این مطالعه تجربی ما به منظور بررسی اثر رادیکال‌های آزاد موجود در پلاسماهای کیسه‌های خون بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، اثر پلاسماهای تهیه شده از کیسه‌های خون طی هفته‌های مختلف را بر میزان فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای و میزان تولید مالون دی آلدهید مورد بررسی قرار دادیم. نتایج نشان داد شاخص تحریکی که نشان دهنده فعالیت و تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی است [۱۶] در سلول‌هایی که با پلاسماهای هفته‌های اول و دوم تیمار شدند در سطح بالاتری در مقایسه با سلول‌های که با پلاسماهای هفته چهارم و پنجم تیمار شده بودند (شکل ۱). در زمینه آزادسازی مالون دی آلدهید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نیز نتایج نشان داد تیمار پلاسماهای هفته‌های مختلف سبب افزایش آزادسازی این ترکیب می‌گردد. این اثر تخریبی بسته به غلظت و زمانی که پلاسما از کیسه‌های خون تهیه شده بودند، متفاوت بود. ولی بطور کلی می‌توان پیش بینی کرد پلاسماهای کیسه‌های خون در هفته‌های انتهایی با غلظت پایین و پلاسماهای تهیه شده از کیسه‌های خون در هفته‌های ابتدایی با غلظت بالا اثر اکسیداسیون بیشتری در آزادسازی مالون دی آلدهید از سلول‌های تیمار شده دارند (شکل ۲). در تأیید نتایج ما اُنگرو و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند نگه داری کیسه‌های خون سبب کاهش دفاع آنتی اکسیدانتی پلاسمای آن‌ها می‌گردد و با گذشت زمان این وضعیت آنتی اکسیدانتی کاهش و غلظت مالون دی آلدهید افزیش پیدا می‌کند [۱۷]. در مطالعه‌ای که توسط مرجانی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ به منظور تعیین تغییرات پراکسیداسیون لیپیدی پلاسمای موجود در کیسه‌های خون انجام شد، مشخص شد میزان فعالیت اکسیدانتی پلاسما و مالون دی آلدهید روند افزیشی را به دنبال ذخیره سازی خون نشان می‌دهد [۱۸]. موُکوپَجیِ در سال ۲۰۱۲ نشان دادند به دنبال انتقال خون به نوزادان محصولات پراکسیداسیون لیپیدی از جمله مالون دی آلدهید افزایش پیدا می‌کند. این افزایش مشاهده شده ممکن است ناشی از واکنش پلاسما با سلول‌های خون محیطی میزبان باشد [۱۹]. آزاد شدن مالون دی آلدهید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نشانه تخریب غشای سلولی می‌باشد و با توجه به اینکه این سلول‌ها ترکیبی از لنفوسیت‌های B، T و منوسیت‌ها می‌باشند، پیش بینی می‌شود پلاسماهای کیسه‌های خون با این اثر مخرب زمینه مهار سیستم ایمنی در دریافت کنندگان خون را فراهم نمایند.

مطالعات قبلی نشان دادند در طول زمان ذخیره سازی خون غلظت نیتریک اکساید در کیسه‌های خون به تدریج افزایش پیدا می‌کند، بطوری که در ۳۰ روز پس از ذخیره سازی حداکثر میزان این ترکیب گزارش شده است [۲۰]. با توجه به اینکه افزایش ذخیره سازی خون با افزایش همولیز و رهاسازی هموگلبولین آزاد همراه است، سبب می‌شود هموگلبولین های آزاد با میل بالا به نیتریک اکساید متصل و سبب دی اکسیداسیون و تخریب نیتریک اکساید گردد [۲۱]. در این موارد کاهش میزان نیتریک با افزایش انقباض عروق و افزایش فشار خون همراه است [۲۱]. رنولدز و همکارانش در سال ۲۰۱۳ میلادی نشان دادند افزودن نیتریک اکساید به گلبولهای قرمز ذخیره شده خون باعث بهبود اکسیژن رسانی آن‌ها می‌شود [۲۲].

هر چند مطالعاتی در زمینه غلظت نیتریک اکساید در کیسه‌های خون و تغیرات غلظت نیتریک اکساید بدنبال انتقال خون صورت گرفته است، اما تا پیش از این مطالعه‌ای در زمینه اثر پلاسماهای کیسه‌های خون بر تولید این ترکیب از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی صورت نگرفته بود. ما در مطالعه حاضر نشان دادیم پلاسمای کیسه خون و بطور خاص پلاسمای تهیه شده از کیسه‌ها طی هفته‌های اول ودوم ذخیره سازی اثر تحریکی در تولید نیتریک اکساید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی دارند (شکل ۳). به عبارت دیگر نگهداری کیسه خون به مدت طولانی توانایی آنها برای القاء تولید نیتریک اکساید از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را کاهش می‌دهد. بررسی‌های بیشتر در این مطالعه نشان می‌دهد این اثر القای تولید نیتریک اکساید از سلول‌های تک هسته‌ای وابسته به غلظت می‌باشد، بطوری که در غلظت‌های بالای پلاسما بیشترین و در غلظت‌های پایین پلاسما کمترین اثر القای تولید نیتریک اکساید مشاهده شد (شکل ۳).

با توجه به اینکه نیتریک اکساید نقش مهمی در ایمنی ذاتی و بروز واکنش‌های التهابی و حتی افزایش بقای بافت پیوندی دارد [۱۲, ۲۳]، به نظر می‌رسد همانند یک شمشیر دو لبه عمل می‌کند. زیرا از یک سو

www.SID.ir

Archive of SID

سبب اثرات مخرب بر عوامل میکروبی و از سوی دیگر در غلظت‌های بالا منجر به آسیب دیدن سلول‌های سالم می‌گردد [۱۲]. نکته‌ای که در مورد نیتریک اکساید مهم است، حفظ تعادل این ترکیب در بدن است به طوری که هر عامل بر هم زننده این تعادل می‌تواند بر وضعیت سلامتی فرد تأثیر گذار باشد [۱۲]. بر اساس یافته‌های این مطالعه پیش بینی می‌نماییم یکی از مکانیسم‌های تغییر تعادل نیتریک اکساید بدنبال انتقال خون، تحریک تولید آن از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بدنبال تزریق خون بخصوص کیسه‌های خون طی هفته‌های اول ذخیره سازی باشد. ما پیش بینی می‌نماییم کیسه‌های خون با نگه داری کوتاه مدت در مقایسه با کیسه‌های خون با نگهداری طولانی مدت به علت میزان کم همولیز گلبول‌های قرمز و اثر تحریکی بیشتر پلاسمایی بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی سبب افزایش بیشتر نیتریک اکساید موجود در خون محیطی می‌گردند.

نتیجه گیری

در مجموع اینطور به نظر می‌رسد که پلاسماهای موجود در کیسه‌های خون بر اساس غلظت و مدت زمانی که از کیسه‌های خون استخراج می شوند می‌توانند اثرات متفاوتی بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی فرد داشته باشند. این اثرات می‌تواند از فعال شدن و تحریک تا تخریب این سلول‌ها متفاوت باشد. این مطالعه یک مطالعه محدود در زمینه اثرات پلاسماهای کیسه خون بر سلول‌های ایمنی بود، بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده اثرات پلاسمای استخراج شده از کیسه‌های خون طی هفته‌های مختلف بر عملکرد و فنوتایپ لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد اخلاق به شماره IR.NKUMS.REC.۱۳۹۸.۰۶۶ در دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی مصوب شده است. نویسندگان این مطالعه از دکتر علی اکبر پورفتح اله عضو هیات علمی دانشگاه تربیت مدرس بواسطه حمایت‌های بی دریغشان در طول این مطالعه کمال سپاس و قدردانی خویش را علام می‌کنند. در ضمن لازم می دانیم از همکاران خویش در گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی نیز در همراهی اجرا این پژوهش تشکر نماییم.

References

1. Harmening DM. Modern blood banking & transfusion practices: FA Davis; 2018.
2. Friedman JM, Cabrales P, Friedman AJ, inventorsCompositions and methods for enhancing red blood cell storage time and survivability using nitric oxide releasing hybrid hydrogel nanoparticles. Google Patents.2017.
3. García-Roa M, del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, Pedraza AC, González-Fernández A, Martín MP. Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. Blood Transfusion. 2017;15(3):222.
4. D'Alessandro A, Liumbruno G, Grazzini G, Zolla L. Red blood cell storage: the story so far. Blood Transfusion. 2010;8(2):82.
5. Kim-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT. Storage lesion: role of red blood cell breakdown. Transfusion. 2011;51(4):844-51. **doi:** 10.1111/j.1537-2995.2011.03100.x **pmid:** 21496045
6. Belousov A, Malygon E, Yavorskiy V, Belousova E. Application of nanotechnology for the preservation of red blood cells. J Advance Nanotechnol. 2018;1(1):18. **doi:** 10.14302/issn.2689-2855.jan-18-2342
7. Barzegar S, Nadali F, Pourfatollah A, Abbaspour A, Farokhinia S, Shiravand Y. Oxidative stress changes in blood bags in consecutive weeks after donation. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2016;13(1):11-8.
8. Bal SH, Heper Y, Kumaş LT, Guvenc F, Budak F, Göral G. Effect of storage period of red blood cell suspensions on helper T-cell subpopulations. Blood Transfusion. 2018;16(3):262.
9. Lannan KL, Sahler J, Spinelli SL, Phipps RP, Blumberg N. Transfusion immunomodulation--the case for leukoreduced and (perhaps) washed transfusions. Blood Cells Mol Dis. 2013;50(1):61-8. **doi:** 10.1016/j.bcmd.2012.08.009 **pmid:** 22981700
10. Baumgartner JM, Silliman CC, Moore EE, Banerjee A, McCarter MD. Stored red blood cell transfusion induces regulatory T cells. J Am Coll Surg. 2009;208(1):110-9. **doi:** 10.1016/j.jamcollsurg.2008.08.012 **pmid:** 19228512
11. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. J Lipid Res. 2016;57(11):1976-86. **doi:** 10.1194/jlr.R066597 **pmid:** 27009116
12. Fukuto JM, Wink DA. Nitric oxide (NO): formation and biological roles in mammalian systems. Routledge: Metal ions in biological systems; 2018.
13. Daraei N, Ghafourian M, Ghadiri A, Amari A, Najafian M, Rokhafrooz S. Evaluation of exhausted regulatory T cells in preeclampsia. Iran J Immunol. 2019;16(2):163-9.
14. Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. The effect of glycyrrhizin on maturation and T cell stimulating activity of dendritic cells. Cell Immunol. 2012;280(1):44-9. **doi:** 10.1016/j.cellimm.2012.11.013 **pmid:** 23261828
15. Wang D, Sun J, Solomon SB, Klein HG, Natanson C. Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. Transfusion. 2012;52(6):1184-95. **doi:** 10.1111/j.1537-2995.2011.03466.x **pmid:** 22188419
16. R. N, N. D, A. A. Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. Veterinary research forum. Urmia University, Urmia, Iran: Faculty of Veterinary Medicine; 2015.
17. Ogunro P, Ogungbamigbe T, Muhibi M. The influence of storage period on the antioxidants level of red blood cells and the plasma before transfusion. African J Med Sci. 2010;39(2):99-104.
18. Marjani A, Moradi A, Ghourcaie AB. Alterations in plasma lipid peroxidation and erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities during storage of blood. Asian J Biochemistr. 2007;2(2):118-23. **doi:** 10.3923/ajb.2007.118.123
19. Mukhopadhyay K, Ali M, Bhattacharya S, Kumar P. 1314 effect of blood transfusion on lipid peroxidation products in sick neonates-an exploratory study. Archiv Disease Childhood. 2012;97(Suppl 2):A375-A. **doi:** 10.1136/archdischild-2012-302724.1314
20. García-Méndez S, Gutiérrez-Salinas J, Cruz-Tovar L. Nitric oxide and meta-hemoglobin in bags for blood transfusion. Revista Mexicana de Medicina Transfusional. 2008;1(1):10-7.
21. Cabrales P, Ortiz D, Friedman JM. NO supplementation for transfusion medicine and cardiovascular applications. Future Sci OA. 2015;1(1). **doi:** 10.4155/fso.15.51 **pmid:** 26807267
22. Reynolds JD, Bennett KM, Cina AJ, Diesen DL, Henderson MB, Matto F, et al. S-nitrosylation therapy to improve oxygen delivery of banked blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(28):11529-34. **doi:** 10.1073/pnas.1306489110 **pmid:** 23798386
23. Drobyski WR, Keever CA, Hanson GA, McAuliffe T, Griffith OW. Inhibition of nitric oxide production is associated with enhanced weight loss, decreased survival, and impaired alloengraftment in mice undergoing graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Blood. 1994;84(7):2363-73. **pmid:** 7522627

www.SID.ir