|  |  |
| --- | --- |
| **پژوهنده (مجله پژوهشي دانشگاه علوم پزشکي شهيد بهشتي)****سال بیستم، شماره 4، پي‌در‌پي 106، صفحات 192 تا 197****مهر و آبان 1394** | تاريخ دريافت مقاله: **30/3/1394**تاريخ پذيرش مقاله: **4/9/1394** |

**بررسي تأثیر غلظت‌های لیزات پلاكت انسانی بر فعالیت متابولیک نوتروفيل‌ها**

***فرشته نجفی1,2، دکتر طاهره ناجی\*1، دکتر فاطمه ياري2، فاطمه گلزاده2***

1. گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران

2. مرکز تحقيقات انتقال خون ايران، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

**چکیده**

**سابقه و هدف:** عملکرد پلاکت‌ها و ساختار بیوشیمیایی آنها در طول زمان نگهداری تغییر می‌کند که به آن، آسیب ناشی از ذخیره (platelet storage lesion) اطلاق می‌شود. مواد مترشحه از پلاکت‌ها روي فعاليت انواع سلول‌های خونی تأثیر دارند. این مطالعه به‌منظور تعيين تأثیر 3 غلظت 5 ،10 و50 ميكروگرم لیزات پلاكتي (در حجم واکنش 200 ميكروليتر) بر فعالیت متابولیک سلول‌های نوتروفيل جهت شناخت بهتر مکانیسم‌های تأثیرگذاری پلاكت بر سلول‌های نوتروفيل در خون، انجام گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** تحقيق به روش تجربي انجام گرفت. کنسانتره پلاكتي از پایگاه انتقال خون تهران تهیه و به دنبال 3 بار فريز- دفريز پلاکت‌ها، لیزات پلاكتي ایجاد شد. غلظت پروتئینی لیزات با روش برادفورد تعیین شد. نوتروفیل از خون محيطي با روش دكستران- فايكول جدا و پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف لیزات پلاكتي، به مدت یک ساعت در شرایط کشت سلولی قرار داده شدند. پس ‌از آن، نوتروفيل‌ها شسته شده و برای بررسی فعالیت متابولیک آنها، آزمونMTT انجام شد. نتایج به ‌دست ‌آمده، با T-Test آنالیز شد.

**یافته‌ها:** غلظت 5 ميكروگرم لیزات پلاكتي در روزهای مختلف پيگيري (نگهداری پلاکت)، بيش از غلظت‌های ديگر می‌تواند سبب فعالیت متابولیک نوتروفيل‌ها شده و این فعالیت، به غلظت لیزات پلاكتي بستگی دارد و اختلاف معنی‌داری بین مورد و شاهد در مقادیر µg 5 و µg 50 از لیزات در حجم واکنشی مشاهده شد (04/0P≤).

**نتیجه‌گیری:** فاکتورهای محلول مشتق شده از پلاکت در لیزات پلاكتي می‌توانند بر فعاليت نوتروفيل‌ها تأثیر بگذارند. به نظر می‌رسد كه غلظت‌های مختلف لیزات پلاكتي اثرات متفاوتي روي فعاليت متابوليك نوتروفيل دارد. این یافته، همسو با مطالعاتی است که در آنها لیزات پلاكتي به‌ عنوان عامل رشد در محیط‌های كشت سلول‌های مختلف استفاده می‌شود و بررسي تأثیر اين غلظت (5 ميكروگرم) را روي ساير سلول‌های ايمني، توصيه می‌نماییم.

**واژگان كليدي:** لیزات پلاكت، آزمون MTT، نوتروفيل

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Najafi F, Naji T, Yari F, Golzadeh F. Survey on the effects of human platelets’ lysate concentrations on the metabolic activation of neutrophils. Pejouhandeh 2015;20(4):192-197.

**مقدمه[[1]](#footnote-1)**

نوتروفيل‌ها از مهم‌ترین سلول‌های ايمني ذاتی، هم در خون و هم در بافت می‌باشند (1). اخیراً مطالعات زيادي در خصوص تأثیر پلاکت‌ها بر نوتروفيل‌ها به‌خصوص تشكيل NETs (Neutrophil extracellular traps) انجام ‌شده (3،2) و نقش آنها در فيزيولوژي و پاتولوژي تشكيل ترومبوز به‌خصوص در عروق عمقي DVT (deep vein thrombosis) بررسي گرديده است (5،4). تشكيل NETs متأثر از ميانكنش سرين پروتئازهاي مترشحه از گرانول‌های نوتروفيل‌ها و همچنين الاستاز و كاتپسين G نوتروفيلي در تعديل واكنش بين پلاکت‌ها و نوتروفيل‌ها می‌باشد (8-6). واکنش نوتروفيل‌ها و پلاکت‌ها و تجمع پلاکت‌ها در اطراف نوتروفیل‌ها بررسي گرديده و عامل تجمع، تیروزین پروتئین‌کیناز پلاکتی است (9). همچنين، فرآورده‌ی پلاکتی به شکل کنسانتره، جهت درمان بیمارانی که مشکلات خون‌ریزی در اثر کمبود یا نواقص عملکردی پلاکت دارند، به‌کار می‌رود. کیسه‌ی پلاکتی از اهداکنندگان و از کیسه‌ی خون كامل تهیه می‌شود و زمان نگهداری آنها در 22 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 تا 5 روز است (10).

طبق تحقیقات انجام ‌شده، ساختار بیوشیمیایی و عملکرد پلاکت‌ها در طی زمان ذخیره‌سازی، تغییر می‌کند که به آن، آسیب ناشی از ذخیره اطلاق می‌شود (storage lesion) (11). ایجاد لخته و جلوگیری از خون‌ریزی، اولین نقش پلاكت در روند ترمیمی زخم است. در مرحله‌ی بعدی، عوامل رشد موجود در پلاكت، آزاد شده و در موضع، ترشح می‌شوند. از بین هزاران عامل رشد می‌توان به عوامل رشد مشتق از پلاكت، عامل رشد عروقی و عامل رشد تمایزی اشاره نمود كه بعد از ترشح باعث رشد و تكثیر سلول‌های پیش‌ساز و همچنین فیبروبلاست‌ها در آن موضع می‌گردند كه این نیز به ‌نوبه‌ی خود، منجر به ترمیم زخم و بهبود آن می‌شود (12). تأثیر لیزات پلاكتي حاوي پلاسماي كم و عاري از پاتوژن روي رشد و گسترش سلول‌های استرومال مزانشيمي، مورد مطالعه قرار گرفته و هدف آن، به دست آوردن محيط مكمل و ايمن و استاندارد براي كشت سلول‌های مزانشيمي است (13). با توجه به اینکه تاکنون اثرات لیزات پلاكتي در محیط کشت سلولی به‌ عنوان جایگزین FBS بررسی‌شده است و این اثر اختصاصاً روی نوتروفیل انجام ‌نشده است، لذا این مطالعه با توجه به طول عمر محدود نوتروفیل اثر لیزات ذکر شده مورد ارزیابی قرارگرفته است. تحقيق به روش تجربي در سال 1393 در سازمان انتقال خون ایران انجام شد.

**مواد و روش‌ها**

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. کیسه‌های پلاكتي از پایگاه انتقال خون تهران پس از گرفتن رضايت از اهداكنندگان تهیه و در روزهای 2، 3 و 5 نگهداری، از کیسه‌ها نمونه‌گیری شد. ابتدا لیزات پلاكتي با پروسه‌ی FT (freeze-thaw) كه همان فريز و دفريز كردن پلاکت‌ها است، تهيه شد. در این روش، پس از حداقل 5 ساعت از فریز شدن سوسپانسيون پلاكتي در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد، انجماد زدایی یا دفريز انجام شد (14). این پروسه 3 بار تکرار و محلول حاصل با دور g 2800 به مدت 15 دقيقه سانتريفوژ شد. بدين ترتيب سوپ رويي حاوی لیزات پلاكتي جدا و با روش برادفورد غلظت پروتئينی آن را تعيين شد.

روش برادفورد كه به دلیل حساسيت و سادگی‌اش، امروزه معمول‌ترین روش اندازه‌گیری كمي پروتئين است، در سال 1976 ابداع شد (15). اين روش بر مبناي توانايي باند شدن رنگ كوماسي به پروتئين در pH اسيدي است. به ‌این‌ ترتیب كه رنگ كوماسي با گروه‌های قابل يونيزه روي پروتئين، واكنش نشان می‌دهد و باعث تغيير شكل در ساختمان پروتئين می‌گردد كه درنتیجه‌ی آن، گروه‌های هيدروفوب پروتئين در سطح قرار گرفته و شرايط براي پيوند غيراختصاصي و برگشت‌ناپذیر كوماسي به پروتئين فراهم می‌شود. باند شدن پروتئين به رنگ كوماسي فرم آبی‌رنگ را تثبیت مي‌كند و منجر به تغيير رنگي متناسب با ميزان پروتئين می‌شود و جذب نوري در طول ‌موج nm 595 سنجیده می‌شود (16). ميزان پروتئين با مقايسه‌ی جذب نوري يك پروتئين مثل آلبومين و رسم يك منحني استاندارد به دست آمد. با به‌کارگیری این روش، غلظت لیزات در روزهای 2، 3 و 5 نگهداری از کیسه‌ها به دست آمد. براي آزمایش‌ها، غلظت‌های 5 ،10 و 50 ميكروگرم (مطالعات مشابه) از لیزات در حجم واکنش كه متشكل از 100 ميكروليتر سوسپانسيون نوتروفيل و 100 ميكرولیتر محیط كشت سلولي غنی‌شده كه جمعاً 200 ميكروليتر می‌شد، در نظر گرفته شد.

جهت جداسازی نوتروفيل‌ها از خون کامل از روش Boyum method استفاده شد. براي اطمينان از سالم و زنده‌بودن سلول‌ها جهت انجام آزمایش‌ها، درصد بقای سلول‌های نوتروفیل (Viability) با تریپان بلو تعیین شد (17).

آزمایش‌ها در دو مرحله انجام شد. اين روش پس از بارها آزمايش set up شد. تعداد نمونه‌های استفاده ‌شده 9 عدد بود و هر غلظت 3 بار گذاشته شد. در مرحله‌ی اول، نوتروفيل‌ها با لیزات پلاكتي مواجه شده و یک ساعت در انكوباتور CO2 دار در Cº 37 قرار گرفتند. در مرحله‌ی دوم، بر روي نوتروفيل‌های به‌دست‌آمده از مرحله‌ی اول، جهت بررسي فعاليت متابوليك نوتروفيل‌ها يا توان حياتي آنها، آزمايش MTT صورت گرفت. MTT یک روش رنگ‌سنجی است و بر اساس احیا و شكسته‌شدن کریستال‌های زردرنگ تترازوليوم با فرمول شيميایي 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide به‌وسیله‌ی آنزيم سوكسينات دهيدروژناز (ميتوكندري) و تشكيل کریستال‌های آبی‌ رنگ نامحلول انجام می‌شود. درنتیجه‌ فرآیند احیا، بلورهای بنفش‌رنگ فورمازان تشکیل می‌شود. سپس این بلورها در حلال مناسب حل‌ شده و به‌وسیله‌ی روش‌های اسپکتروفتومتری مقدارسنجی می‌شوند. مقدار بلور فورمازان ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده‌ی فعاليت متابوليك باشد. سلول‌هایی كه از نظر متابوليكي فعال هستند روند احياي MTT را انجام داده و به ‌عنوان سلول زنده در نظر گرفته می‌شوند (18).

در این روش، 100 ميكرو ليتر سوسپانسیون نوتروفيل با تعداد پانصد هزار سلول نوتروفيل (غلظت 105×5 سلول در میلی‌لیتر) در 100 میکرولیتر RPMI غنی‌شده (محيط كشت سلولي) با مقدار 5، 10 و 50 ميكروگرم از لیزات پلاكتي مواجه شد. در چاهک كنترل، فقط نوتروفيل و محيط كشت سلولي وجود داشت. پليت كشت سلولي به مدت یک ساعت در انكوباتور CO2دار در Cº 37 قرار گرفت. پس از شستشو با PBS، سلول‌ها در حجم 100 ميكروليتر از محيط كشت به پلیت کشت سلولی ریخته شده و به هر چاهک، 10 ميكروليتر معرف MTT (زردرنگ) اضافه شد. پلیت به مدت 4 ساعت در انكوباتور CO2دار در دمای Cº 37 قرار داده شد. سپس روي رسوب ایجاد شده، 100 ميكروليتر حلال (اسیدکلریدریک-SDS) ريخته شد. پلیت در طول شب (حدود 15 ساعت) در انكوبـاتور Cº 37 قرار داده شد. جذب نوری هر چاهک در طول‌ موج nm 575 قرائت شد (19). در نهایت، میزان فعالیت متابوليك نوتروفيل‌ها با فعالیت پایه سلول‌های مواجه شده با بافر (نمونه‌ی کنترل) مقایسه شد (در نوتروفيل‌های فعال‌ شده، ميتوكندري‌ها فعال بوده و آنزيم سوكسينات دهيدروژناز آنها، سبب احیا و شکسته شدن کریستال‌های زردرنگ تترازوليوم معرف MTT و تشكيل کریستال‌های آبی‌رنگ نامحلول می‌شود كه ارزيابي كمي آن میزان فعالیت متابوليك نوتروفيل‌ها را نشان می‌دهد). با توجه به تعداد نمونه‌ها (9 نمونه) و مقایسه‌ی هر نمونه با کنترل نوتروفیل (سوسپانسیون سلول‌های نوتروفیل در PBS به‌ عنوان کنترل منفی يا شاهد)، داده‌هـای به‌دست‌آمده بـا نرم‌افزار 16 SPSS و روش آماري T-Test نسبت به گروه شاهد، آنالیز شد.

**یافته‌ها**

ميزان فعالیت متابوليك نوتروفيل‌ها درمقابل غلظت‌های مختلف ليزات در جدول شماره 1 ارایه ‌شده و نشان می‌دهد كه در مقایسه غلظت‌های 5،10 و 50 ميكروگرم از لیزات پلاكتي در حجم واکنش (متشكل از 100 میکرولیتر سوسپانسيون نوتروفيل و 100 ميكرولیتر محیط كشت سلولي غنی‌ شده كه جمعاً 200 ميكروليتر می‌شد) در روزهای 2، 3 و 5 نگهداری، فعالیت بیشتر در مقدار 5 میکروگرم از لیزات پلاکتی به دست آمد (نمودار شماره 1) و اختلاف مقادیر MTT به‌ دست‌آمده در مقادیر 5 و 50 میکروگرم (در حجم واکنشی 200 میکرولیتر) در تمامی روزهای مورد مطالعه معنی‌دار بود: در روز دوم، 014/0 = P-value، در روز سوم، 022/0 = P-value و در روز پنجم، 021/0 = P-value بود (نمودار 2).

**بحث**

تحقيق حاضر نشان داد كه در غلظت 5 ميكروگرم لیزات پلاكتي در روزهای مختلف پي‌گيري (نگهداری پلاکت) بيشترين فعاليت وجود دارد و نتیجه‌ی این تحقیق همسو با تعدادی از مطالعات است. ازجمله در مطالعات Bieback در سال 2013 لیزات پلاكتي به‌ عنوان يك جايگزين خوب برای سرم جنين گوساله براي كشت سلول‌های بنيادي مزانشيمال در نظر گرفته شد. اين تحقيق نقش مؤثـر لیزات پلاكتي را در

**نمودار 1. ميزان فعالیت متابوليك نوتروفيل‌ها برحسب غلظت‌های مختلف ليزات به تفكيك روزهای 2، 3 و 5 نگهداری.**

**نمودار 2. ميزان فعالیت متابوليك نوتروفيل‌ها برحسب غلظت‌های 5 و 50 میکروگرم ليزات (در حجم واکنشی 200 میکرو لیتر) به تفكيك روزهای 2، 3 و 5 نگهداری.**

**جدول 1. ميزان فعالیت متابوليك نوتروفيل‌ها برحسب غلظت‌های مختلف ليزات پلاكت انساني در روزهاي نگهداری 2، 3 و 5 به‌‌وسیله‌ی آزمون MTT.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| N=9 | Optical Density575 nm (mean) | نتيجه آزمون (P-value نسبت به گروه شاهد) |
| نتايج نمونه‌های كنترل (نوتروفیل + بافر) | 042/0±08/0 | 6/0 |
| نوتروفیل + 5 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 2) | 02/0±82/0 | 007/0 |
| نوتروفیل + 5 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز3) | 14/0±72/0 | 017/0 |
| نوتروفیل + 5 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 5) | 19/0±04/1 | 029/0 |
| نوتروفیل + 10 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 2) | 05/0±44/0 | 048/0 |
| نوتروفیل + 10 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 3) | 14/0±64/0 | 034/0 |
| نوتروفیل + 10 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 5) | 2/0±54/0 | 049/0 |
| نوتروفیل + 50 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 2) | 05/0±3/0 | 180/0 |
| نوتروفیل + 50 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 3) | 22/0±41/0 | 364/0 |
| نوتروفیل + 50 میکروگرم لیزات پلاكتي (روز 5) | 21/0±4/0 | 637/0 |

سلول‌های مزانشيمي به زیر رده‌های مختلف مانند استئوبلاست، كندروسيت، آديپوسيت و استئوبلاست، نشان داد (20). مطالعه‌ی El Backly و همكاران در سال 2011 نشان داد که مولکول‌های مشتق از پلاكت می‌توانند بازسازي و بهبود جراحت‌های بزرگ را سرعت بخشند و اين كار را به‌وسیله‌ی هدف قرار دادن يك آبشار التهابي و داشتن نقش آنتي‌ميكروبيال با تأثیر روي نوتروفيل‌ها براي افزايش توليد ليپوكالين‌های وابسته به ‍‍‍‍ژلاتيناز كه بعد از شرايط التهاب اتفاق می‌افتد، انجام می‌دهند (21). از طرفی، در مطالعه‌ی Pereira و همکاران در سال 2013، تأثیر دوگانه‌ی لیزات پلاكتي روي غضروف آرتيكولار (مفصلی) بررسي شد: يكي به‌عنوان نگهدارنده‌ی بالقوه‌ی كندروژنيك و دیگری به‌ عنوان عامل ضدالتهابی گذرا كه به دنبال التهاب جدی پيش می‌آید. PRP يا پلاسماي غني از پلاكت (Platelet Rich Plasma) مخلوطي از فاكتورهاي رشد و پروتئین‌های بيواكتيو است كه می‌تواند در تمايز و بازسازي غضروف آرتيكولار تأثیر به سزايي داشته باشد و لیزات پلاكتي به‌طور جدی سبب افزايش القای سنتز سيتوكين‌های IL-6 و IL-8 و ژلاتيناز وابسته به ليپوكالين نوتروفيل‌ها می‌شود (22). ما در این مطالعه از روش فريز- دفريز جهت به‌دست آوردن لیزات پلاکتی استفاده کردیم. این روش، مشابه روش به‌کار گرفته ‌شده توسط Sae Yun Baik و همكاران در سال 2013 است. آنها تأثیر لیزات پلاكتي را در تكثير سلول‌های HaCat (The human immortal keratinocyte cell line) بررسي نمودند. در مطالعه‌ی ایشان، لیزات پلاكتي به‌عنوان جايگزينی براي FBS (سرم جنین گاوی) در کشت سلولي آزمايش شد و از تعداد مختلف سلول، میزان متفاوت لیزات پلاكتي و FBS استفاده شد. مشخص گردید لیزات پلاكتي حاوي مقادير بالايي از فاكتورهاي رشد نظير TGF-α (transforming growth factor-alpha)، VEGF (vascular endothelial growth factor)، IGF (insulin like growth factor)، EGF (epidermal growth factor) و همچنین PDGFAB/BB PDGF-AA (platelet-derived growth factor) می‌باشد (14).

انتخاب روزهای 2، 3 و 5 به دو دلیل انجام شد: 1- وجود مطالعات مشابه، 2- در روز دوم نگهداری، نتایج غربالگری و آزمون‌های عفونی مشخص می‌شود و حداكثر زمان نگهداري فرآورده‌ی پلاكت تا روز 5 در سيستم بسته است و روز 3 حد واسط روز 2 و 5 است.

در این مطالعه، از روش MTT جهت نشان دادن فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی پلاکت استفاده شد که خود، بیانگر بقای این سلول‌ها نیز می‌باشد. در این راستا، مطالعات زیر ازنظر به‌کارگیری این روش، با مطالعه‌ی ما هم‌خوانی دارند. Dain Son و همکاران فاکتورهای رشد ضد آپوپتوزی پلاکت را بر ماکروفاژها با استفاده از آزمون MTT بررسی‌ نمودند (23). در مطالعه‌ی Shiri و همکاران، تأثیر یک پپتید مهارگر کاسپاز 3، بر بقای پلاکت کنسانتره در طول زمان ذخیره با استفاده از آزمون MTT بررسی شده است (24). درعین‌حال، آزمون MTT یکی از روش‌هایی است که برای ارزیابی سیتوتوکسیتی سلول‌ها کاربرد دارد (18).

**نتیجه‌گیری**

یافته‌های اين تحقيق همسو با مطالعاتی است که در آنها لیزات پلاكتي به‌ عنوان عامل رشد در محیط‌های كشت سلول‌های مختلف استفاده می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مولکول‌های مشتق از پلاکت در لیزات پلاكتي می‌توانند بر بقا و فعاليت متابوليك نوتروفيل‌ها تأثیر گذاشته و با توجه به عمر كوتاه نوتروفيل‌ها به ‌عنوان يك جايگزين خوب به‌ جای مواد بیولوژیک مانند FBS در محیط كشت اين سلول‌ها، در نظر گرفته شوند (25،20). نوتروفيل‌ها از مهم‌ترین سلول‌های بدن در مواجهه با بیماری‌های عفوني به دليل داشتن فعاليت باكتري‌كشي درون واكوئلي از طريق اثر H2O2، آنيون سوپر اكسيد (ˉO2)، ميلوپراكسيداز و يك يون هاليد تولیدکننده‌ی هالوژن آزاد، و يا از طريق ساير فعالیت‌های آنزيمي می‌باشند و نسبت به ساير سلول‌های سيستم ايمني طول عمر کوتاه‌تری دارند (26). لذا، با نتايج به‌دست‌آمده از اين تحقیق، می‌توان از لیزات پلاكتي جهت افزايش فعاليت متابوليك و بقای سلول‌های نوتروفيل و ديگر سلول‌ها در شرایط كشت سلولی، استفاده نمود.

پیشنهاد می‌شود تأثیر غلظت‌های مختلف لیزات پلاكتي روي ساير سلول‌های سيستم ايمني از جمله منوسیت‌ها، بررسی گردد.

**تشکر و قدردانی**

بدین‌وسیله از مؤسسه‌ی عالی طب انتقال خون ایران به دلیل کمک‌های معنوی و علمی تشکر می‌گردد.

***REFERENCES***

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al*. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004;303(5663):1532–5.

2. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. Blood 2014;123(18):2768–76.

3. Page C, Pitchford S. Neutrophil and plateletcomplexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. Int Immunopharmacol 2013;117:1176–84.

4. Gardiner EE, Andrews RK. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection related vascular dysfunction. Blood Rev 2012;26:255–9.

5. Gardiner EE , Ward CM , Andrews RK. The NET effect of clot formation. J Thromb Haemostas 2012;10:133–5.

6. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. Int J Lab Hematol 2013; 35:254–61.

7. Clark SR, Ma AC, Tavener SA et al. PlateletTLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood.Nat Med .2007; 13: 463–9.

8. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, *et al*. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med 2007;13(4):463–9.

9. [Koda M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Koda%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16287615), [Banno Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Banno%20Y%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16287615), [Naganawa T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Naganawa%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16287615). Effect of neutrophil adhesion on the size of aggregates formed by agonist-activated platelets. [Platelets](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287615) 2005;16(8):482–91.

10. [Hogge DE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hogge%20DE%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=3952787), [Thompson BW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Thompson%20BW%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=3952787), [Schiffer CA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schiffer%20CA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=3952787). Platelet storage for 7 days in second-generation blood bags. [Transfusion](file:///Y%3A%5CPublic%5C%D9%BE%D8%B1%D9%88%D9%BE%D8%A7%D8%B2%D8%A7%D9%84%20%D9%88%20%D8%B1%D9%81%D8%B1%D8%A7%D9%86%D8%B3%5CPlatelet%20storage%20for%207%20days%20in%20second-ge...%20%5BTransfusion.%201986%20Mar-Apr%5D%20-%20PubMed%20-%20NCBI.htm) 1986; 26:131-5.

11. Devine DV, Serrano K. The platelet storage lesion. Clin Lab Med 2010;30(2):475–87.

12. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli ML, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2015;23(9):2459–74.

13. Iudicone P, Fioravanti D, Bonanno G, Miceli M, Lavorino C, Totta P, *et al*. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. J Transl Med 2014;12(1):28.

14. [Baik SY](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Baik%20SY%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24422195), [Lim YA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lim%20YA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24422195), [Kang SJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kang%20SJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24422195), [Ahn SH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ahn%20SH%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24422195), [Lee WG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20WG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24422195), [Kim CH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kim%20CH%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24422195). Effects of platelet lysate preparations on the proliferation of HaCaT cells. Ann Lab Med 2014;34:43–50.

15. Bradford. Isfahan University of Medical Siences. Available from: http://www.mui.ac.ir.

16. Gonzlez M, Mayolo-Deloisa K, Rito-Palomares M, Winkler R. Colorimetric protein quantification in aqueous two-phase systems. Process Biochem 2011;46(1):413–7.

17. Bioyuum A. Isolation of mononuclear cells and granolucyte fom human blood: Isolaion of mononuclear cells by combind centrifugation and sedimentation at 1g. Scand J Clin Lab Invest 1968; 21(suppl 97):77–89.

18. [Tonder](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=van%20Tonder%20A%5Bauth%5D) A, [M Joubert](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Joubert%20AM%5Bauth%5D) A, [Duncan Cromarty](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cromarty%20AD%5Bauth%5D) A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Res Notes 2015;8(1):47.

19. Li Y, Huang W, Huang S, Du J, Huang C. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay. Biochem Biophys Res Commun 2012;422(1):85–90.

20. Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serumin mesenchymal stromal cell cultures. Transfus Med Hemother 2013;40:326–335.

21. [El Backly R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=El%20Backly%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21385008), [Ulivi V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ulivi%20V%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21385008), [Tonachini L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tonachini%20L%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21385008), [Cancedda R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cancedda%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21385008), [Descalzi F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Descalzi%20F%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21385008), [Mastrogiacomo M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mastrogiacomo%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21385008). Platelet lysate induces in vitro wound healing of human keratinocytes associated with a strong proinflammatory response. [Tissue Eng Part A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385008) 2011;17(13–14):1787–800.

22. Pereira RC, Scaranari M, Benelli R, Strada P, Reis RL, Cancedda R, *et al*. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution. Tissue Eng Part A 2013;19(11–12):1476–88.

23. Son D, Na YR, Hwang ES, Seok SH. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) induces anti-apoptotic effects on macrophages through Akt and Bad phosphorylation. J Biol Chem 2014;289(9):6225–35.

24. Shiri R, Yari F, Amirizadeh N, Gharehbaghian A, Ahmadinejad M, Tabatabaie MR. Effects of caspase 3 inhibitor on the survival of platelet concentrate during storage. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014;10(4):319–25.

25. Pirvu TN, Schroeder JE, Peroglio M, Verrier S, Kaplan L, Richards RG, *et al*. Platelet-rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production. Eur Spine J 2014;23(4):745–53.

26. McPherson RA, Pincus MR, editors. Henry Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Saunders Elsevier; 2011. p. 556–800, 734–40.

1. **\*نويسنده مسؤول مكاتبات:** **دکتر طاهره ناجی؛** تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، گروه علوم سلولی و مولکولی؛ **پست الكترونيك:** tnaji2002@gmail.com [↑](#footnote-ref-1)