نسخة ⑤

بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين أنعمت عليهم
غير المغضوب عليهم ولا الضالين

١٩٦٢

۸۷/۱۱/۰۹۲۵۳
۸۷-۱۲۵

دانشگاه‌تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون

بررسی توانایی القاء آپوپتوزیس و تعدیل ایمنی خون نگهداری شده در شرایط آزمایشگاهی

نگارش:
مرجان حاج هاشمی

استاد راهنما:
دکتر علی اکبر پورفتح اله

استاد مشاور:
دکتر مهناز آقایی پور

۱۳۸۷ /۱۱/ ۱۵

تابستان ۸۷

۱۰۹۰۶۲

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

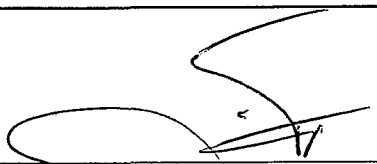
بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مرجان حاج هاشمی رشته: هماتولوژی گرایش: تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

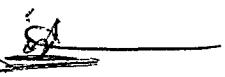
دکتر علی اکبر پور فتح الله (استاد راهنما)

دکتر مهناز آقایی پور (استاد مشاور)

دکتر محمودیان شوشتری (استاد ناظر)



دکتر مسعود سلیمانی (استاد ناظر)



دکتر سعید کاویانی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی ـ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود ،مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر " دفتر نشر آثار علمی " دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند :

" کتاب حاضر ، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد /~~رساله دکتری~~ نگارنده دررشته جراحی... است که در سال .....۸۷..... دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقای دکتر علیرضا ابوی اله ، مشاوره ..... دکتر جعفر ... از آن دفاع شده است."

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ،تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قراردهد .

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳ ، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ،تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند ،به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب برجان حاج هاشمی..... دانشجوی رشته جراحی..... مقطع دکتری... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی برجان حاج هاشمی

تاریخ و امضا ۸۷/۷/۲۸

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگي . مرجان حاج هاشم
تاریخ و امضاء ۸۷/۷/۲۸

تقدیم به

پدر و مادر فداکارم

که همواره دعای خیرشان روشنی‌بخش مسیر زندگیم بوده است.

تقدیم به

همسر عزیزم به پاس مهربانی‌ها و زحمات بی دریغش

درابتدا لازم می‌دانم از استاد محترم راهنما جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله که با وسعت نظر، راهنمایی‌ها و کمک‌های همیشه ارزنده‌شان هدایت پایان‌نامه را به عهده داشته‌اند، سپاسگزاری نمایم.

از اساتید مشاور محترم ، سرکار خانم دکتر مهناز آقایی پور و جناب آقای دکتر سید محمد مؤذنی که رهنمودها و کمک های ارزنده ایشان در کلیه مراحل نقش به سزایی در به ثمر رسیدن این پایان‌نامه داشته است،تشکر می‌نمایم.

انجام شدن بخش مهمی از این پایان‌نامه را مدیون لطف سرکار خانم دکترنیکوگفتار هستم که سپاسگزاری عمیقی را می‌طلبد.

از اساتید محترم گروه جناب آقای دکتر پورفتح الله، جناب آقای دکترکاویانی، جناب آقای دکترسلیمانی که در طول تحصیل از محضرشان بهره برده‌ام نهایت امتنان را دارم.

در انتها از سایر عزیزانی که به نوعی در انجام این پایان‌نامه مرا یاری داده‌اند صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نمایم.

چکیده:

انتقال خون نقش گسترده و انکار ناپذیری در ارتقاء سلامت و افزایش طول عمر بشر داشته است. با وجود تلاش های زیاد و همه جانبه برای کاهش خطرات انتقال خون و دسترسی به خون کاملاً سالم و بی خطر، هنوز هم انتقال خون خالی از عوارض و اثرات جانبی نمی باشد. از جمله این عوارض، تعدیل ایمنی مرتبط با انتقال خون (TRIM) می باشد. از میان اثرات TRIM می توان به افزایش بقاء وکاهش رد پیوند اعضاء جامد و توپر نظیر کلیه، افزایش شیوع عفونت‌های پس از عمل جراحی، افزایش شیوع سرطان و عود سریع یا رشد تومورهای جامد اشاره کرد. یکی از مکانیسم هایی که از طریق آن انتقال خون قادر به ایجاد اثرات تعدیل ایمنی در گیرنده می باشد، وجود و تجمع ملکول‌های محلول همچون soluble Fas Ligand (sFas L) در فرآورده های خونی حاوی گلبول های سفید می باشد. مولکول sFas L پس از اتصال به گیرنده خود (Fas receptor) بر روی سلول هدف، قادر به ایجاد آپوپتوز در آن سلول می باشد. مطالعات نشان داده است که مقدار این مولکول ها با افزایش مدت زمان ذخیره سازی خون افزایش می یابد. در این مطالعه به بررسی تغییرات غلظت مولکول sFas L در زمان نگهداری خون کامل و بررسی تأثیر جزء پلاسمایی خون کامل نگهداری شده در القای آپوپتوزیس در سلول های Jurkat که Fas + می باشند و در سلول های تک هسته ای جدا شده از خون محیطی تازه پرداخته شد. نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت sFas L در نمونه های پلاسمایی جمع آوری شده نشان داد که با افزایش زمان ذخیره سازی، غلظت این ماده نیز در پلاسما به طور خطی افزایش می یابد. نتایج حاصل از تأثیر بخش پلاسمایی خون بر روی سلول های Jurkat نشان دهنده توانایی پلاسما در القای آپوپتوزیس در این سلول ها بود و این اثر با افزایش زمان نگهداری خون تشدید می شد. به عبارت دیگر هر چه پلاسما کهنه تر می شد به همان میزان نیز توانایی اش در القای آپوپتوزیس در سلول های Jurkat بیشتر می گردید. همچنین در بررسی تأثیر جزء پلاسمایی خون کامل در القای آپوپتوزیس در سلول های تک هسته ای جدا شده از خون محیطی تازه مشخص گردید که در سلول های مجاور شده با پلاسمای کهنه تر نسبت به سلول های مجاور شده با پلاسمای تازه تر درصد آپوپتوز بالاتر می باشد. به طور کل، نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده وجود مقادیر بالاتر عوامل آپوپتوتیک در پلاسمای نگهداری شده به مدت طولانی تر در مقایسه با پلاسمای تازه تر بود. به عبارت دیگر هر چه از زمان ذخیره سازی خون می گذرد مقدار مواد محلول موجود در آن که قادر به القای آپوپتوزیس می باشند نیز بیشتر می شود.

کلمات کلیدی: آپوپتوزیس، خون کامل، زمان نگهداری، سلول های تک هسته ای، TRIM ، sFas L .

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

فصل اول- مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته.....۱

۱-۱. مقدمه.....۲

۱-۲. مروری بر مطالعات انجام شده.....۸

۱-۲-۱. تعدیل ایمنی مرتبط با انتقال خون.....۸

۱-۲-۱-۱. عوارض انتقال خون.....۱۱

۱-۲-۱-۲. تغییرات سیستم ایمنی پس از انتقال خون.....۱۲

۱-۲-۲. اثرات تعدیل ایمنی مرتبط با انتقال خون.....۱۳

۱-۲-۲-۱. انتقال خون و پیوند کلیه.....۱۴

۱-۲-۲-۲. تزریق خون آلوژنیک و عفونت باکتریایی بعد از عمل جراحی.....۱۵

۱-۲-۲-۳. رشد تومور و تزریق خون آلوژنیک.....۱۶

۱-۲-۲-۴. انتقال خون و سقط های مکرر و خود به خود.....۱۷

۱-۲-۲-۵. انتقال خون و دیگر بیماری ها.....۱۷

۱-۲-۳. مکانیسم‌های تعدیل ایمنی مرتبط با انتقال خون.....۱۸

۱-۲-۳-۱. حذف کلونی.....۱۸

۱-۲-۳-۲. آنرژی یا بی پاسخی ایمونوژیک.....۱۹

۱-۲-۳-۳. سرکوب ایمنی.....۲۰

۱-۲-۳-۴. جهت‌گیری به سمت پاسخ‌هایTh2.....۲۱

۱-۲-۳-۵. میکروکایمریسم مختلط.....۲۲

۱-۲-۳-۶. نقش گلبول‌های سفید.....۲۲

۱-۲-۳-۷. نقش ملکول‌های HLA محلول و غشایی.....۲۳

۱-۲-۳-۸. بروز تغییرات آپوپتوتیک طی ذخیره‌سازی فرآورده‌های خونی.....۲۴

۱-۲-۳-۹. یوبی کوئیتین موجود در گلبول های قرمز.....۲۷

۱-۲-۴. مرگ سلولی.....۲۸

۱-۲-۴-۱. نکروز.....۲۹

۱-۲-۴-۲. مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز.....۳۰

۱-۲-۴-۲-۱. تغییرات مرفولوژیک و بیوشیمیایی مشاهده شده در آپوپتوز..... ۳۱
۱-۲-۴-۲-۲. تفاوت آپوپتوز با نکروز..... ۳۳
۱-۲-۴-۲-۳. عوامل ایجاد کننده ی آپوپتوز..... ۳۴
۱-۲-۴-۲-۴. چگونگی شناسایی سلول آپوپتوتیک توسط ماکروفاژ..... ۳۵
۱-۲-۴-۲-۵. بروز فسفاتیدیل سرین در سطح خارجی غشاء سلولهای آپوپتوتیک..... ۳۵
۱-۲-۴-۲-۶. پروئین‌های خانواده Annexin..... ۳۷
۱-۲-۴-۲-۷. عوامل تنظیم کننده آپوپتوز..... ۳۸
۱-۲-۴-۲-۸. القاء آپوپتوزیس از طریق مسیر Fas-Fas L..... ۴۵
۱-۲-۴-۲-۹. روشهای شناسائی آپوپتوز..... ۴۶

فصل دوم- مواد و روش ها..... ۵۰
۲-۱. مواد و وسایل..... ۵۱
۲-۱-۱. مواد..... ۵۱
۲-۱-۲. وسایل..... ۵۲

۲-۲. روش ها..... ۵۳
۲-۲-۱. طرز تهیه محیط RPMI-۱۶۴۰..... ۵۳
۲-۲-۲. تهیه رنگ تریپان بلو..... ۵۴
۲-۲-۳. شمارش سلول..... ۵۴
۲-۲-۴. تعیین درصد زنده بودن سلولها(Viability test)..... ۵۴
۲-۲-۵. نحوه کشت رده سلولی جرکات(Jurkat cell line)..... ۵۵
۲-۲-۵-۱. نحوه پاساژ دادن سلول های جرکات..... ۵۶
۲-۲-۵-۲. روش فریز نمودن سلول..... ۵۶
۲-۲-۵-۳. روش دفریز نمودن سلول..... ۵۷
۲-۲-۶. تهیه بافر لیزات..... ۵۸
۲-۲-۷. جمع آوری نمونه مورد مطالعه..... ۵۸
۱-۲-۷-۱. جداسازی پلاسما (محلول رویی) از کیسه های خون..... ۵۹
۲-۲-۷-۲. جداسازی سلول های تک هسته ای خون توسط فایکول..... ۵۹
۲-۲-۸. نحوه آماده سازی سلول ها جهت انجام آنالیز فلوسایتومتری..... ۶۰
۲-۲-۹. اندازه گیری غلظت sFas Ligand در نمونه های جمع آوری شده به روش الایزا..... ۶۱
۲-۲-۱۰. روش های آماری..... ۶۳

فصل سوم- نتایج ۶۴
۳-۱. نتایج ۶۵
۳-۱-۱. تیمار سلولهای Jurkat در مجاورت پلاسمای جدا شده ۶۶
۳-۱-۱-۱. تعیین میزان آپوپتوزیس در سلولهای Jurkat تیمار شده با پلاسما ۶۷
۳-۱-۱-۲. مشاهدات میکروسکوپی سلول های Jurkat ۷۳
۳-۱-۲. تیمار سلول های تک هسته ای جدا شده از خون تازه ۷۶
۳-۱-۲-۱. تعیین میزان آپوپتوزیس در سلول های تک هسته ای جدا شده از خون تازه ۷۷
۳-۱-۳. تعیین غلظت soluble Fas Ligand در نمونه های پلاسمایی جمع آوری شده ۸۰
فصل چهارم – بحث ۸۲
۴-۱. بحث ۸۳
پیشنهادات ۸۹
منابع و مراجع ۹۰

فصل اول

مقدمه

و

مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱. مقدمه

سالهای زیادی است که طب انتقال خون[1] جایگاه مهم و وسیعی در علم پزشکی پیدا کرده است. مطمئناً در مورد تأثیر درمانی تزریق خون شکی وجود ندارد، اما انتقال خون ضمن مواهب و منافعی که برای حفظ بقای بسیاری از اشخاص نیازمند داشته، با عوارض و مشکلاتی نیز همراه بوده است و همین مسئله باعث شده که امروزه یکی از مسائل مهم در رابطه با طب انتقال خون، اطلاع از عوارض جانبی فرآورده‌های خونی باشد. در واقع می توان گفت که یکی از راههای مؤثر و سودمند در کاهش عوارض ناشی از مصرف خون و فرآورده‌های خونی، شناخت صحیح و کامل این عوارض و در نتیجه انجام اعمالی برای به حداقل رساندن آنهاست. عوارض تزریق خون که همچون مانعی بر سر راه تزریق خون آلوژنیک قرار داشته و دلیل ممنوعیت قانونی تزریق خون به مدت طولانی در برخی از کشورهای اروپای غربی بوده اند ماهیت ایمونولوژیک و غیر ایمونولوژیک دارند. از جمله این عوارض و مشکلات که با وجود تحقیقات فراوان، هنوز هم بصورت کامل شناخته نشده است ، تعدیل ایمنی مرتبط با انتقال خون[2] می‌باشد [۱و۲]. نقش احتمالی تعدیل ایمنی مرتبط با انتقال خون (TRIM) اولین بار توسط Billingham ، در سال ۱۹۵۳ شرح داده شد و بیشتر از ۳۰ سال است که موضوع مورد بحث بسیاری از محققین بوده است و گفته‌های ضد و نقیضی در رابطه با آن وجود دارد تا جاییکه می‌توان گفت که بعضی از محققان اعتقادی به آن نداشته‌اند. Billingham و همکارانش نشان دادند که تزریق خون آلوژن به جنین موش باعث القاء تحمل و قبول پیوند پوست از موش دهنده می‌گردد [۵-۳]. در سال ۱۹۶۴ مطرح شد که پیوند کلیه در مدلهای تجربی سگ، به مدت طولانی تری بقا می‌یابد به شرطی که دریافت کننده از حیوان دهنده، یک بار خون دریافت کرده باشد. چندین سال بعد تجربه‌ای مشابه آن در موارد انسانی مشاهده شد. نقش سودمند تعدیل ایمنی ناشی از انتقال خون در بقاء پیوند کلیه،

---

[1] Blood transfusion
[2] Transfusion Related Immunomodulation / TRIM

اولین بار توسط Opelz و همکارانش در سال ۱۹۷۳ گزارش شد [۶و۷]. مطالعه‌ای که توسط این گروه انجام شد، نشان داد که میزان بقای یکساله پیوند [1] در بیمارانی که قبل از عمل پیوند، تزریق خون شده بودند نسبت به کسانی که خون نگرفته بودند، به طور قابل توجه‌ای بیشتر بود. مطالعات بعدی هم این یافته را تأیید کردند و عمل تزریق یک یا چند واحد خون به منتظرین پیوند کلیه قبل از انجام عمل پیوند، به عنوان یک ابزار برای افزایش میزان بقای پیوند، بطور گسترده مورد قبول قرار گرفت. این وضعیت تا زمان ظهور سیکلوسپورین ها در اوایل دهه ۸۰ ادامه پیدا کرد. بعد از آن اثرات سودمند انتقال خون قبل از پیوند در افزایش بقاء پیوند مورد ملاحظه قرار نگرفت و استفاده از این نوع انتقال خون به آرامی کاهش یافت [۳و۸]. به طور کلی در طی این سالها گزارش های زیادی مبنی بر اثرات بالینی سودمند TRIM در منتظرین پیوند کلیه و در زنان دچار سقط مکرر و خودبخودی جنین [2] منتشر شده است. دیده شده که انتقال خون آلوژن باعث کاهش میزان سقط در این زنان شده است. اغلب محققین، این اثرات را به سرکوب سیستم ایمنی میزبان پس از انتقال خون آلوژنیک ربط داده‌اند. سرکوب سیستم ایمنی میزبان، اثرات زیان‌آوری نیز در پی دارد و مطالعاتی که انجام شده نیز این مسئله را تأیید کرده اند که انتقال خون آلوژنیک می‌تواند باعث توسعه یا پیشرفت بیماریهای مختلف ویروسی و باکتریایی و بیماریهای بدخیم، افزایش عود و رشد بدخیمی و یا متاستازها، عوارض عفونی کشنده به دنبال جراحی‌های بزرگ قلبی و شکمی شود[۸و۹].

قبلاً تصور می‌شد که اثر سرکوب ایمنی ناشی از انتقال خون به گرانباری (فزونی) آهن و فراباری [3] سیستم رتیکولواندوتلیال توسط گلبولهای قرمز متلاشی شده در حین نگهداری خون که منجر به کاهش عملکرد ماکروفاژها می‌گردد مربوط می باشد. اما اکنون این مسئله مورد پذیرش عموم قرار گرفته است که این اثر تا حد زیادی به علت حضور گلبولهای سفید در خون تزریق شده است، زیرا

---

[1] 1-year graft survival
[2] Recurrent Spontaneous Abortion/RSA
[3] Overload

که مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اثر سرکوب سیستم ایمنی میزبان در اثر انتقال خون، زمانی که حجم گلبولهای سفید در خون تزریقی کمتر باشد، کاهش می‌یابد [۳و۹]. در حال حاضر علاوه بر نقش گلبولهای سفید در TRIM ، مکانیسم‌های متعدد دیگری برای اثرات سرکوب کننده ایمنی ناشی از انتقال خون مطرح شده‌اند که از مهمترین آنها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: حذف کلونی رده‌های سلولی اختصاصی، آنرژی کلونی و انتخاب سلولهای non-responder ، سرکوب پاسخ ایمنی، جهت‌گیری به سمت پاسخ‌های Th2، میکروکایمریسم مختلط[1]، نقش گلبولهای سفید، تجمع مولکولهای محلول HLA-I و Fas Ligand ، بروز تغییرات آپوپتوتیک طی ذخیره‌سازی[2] فرآورده های خونی، تولید آنتی بادیهای ضد ایدیوتایپی، نقش سلولهای کشنده طبیعی [۱۰و۱۱].

در مورد نقش گلبولهای سفید باید گفت که این سلولها در فرآورده‌های سلولی خون وجود دارند و باعث اثرات جانبی مفید و مضر در دریافت کنندگان خون آلوژنیک می‌شوند. از جمله این اثرات باید بهGVHD ، انتقال عوامل عفونی، ایمنی زایی علیه HLA و تعدیل ایمنی اشاره کرد.گلبولهای سفید موجود در واحدهای خونی، طی ذخیره‌سازی از خود، مولکولهای محلولی ترشح می‌کنند که این مولکولها نیز می‌توانند باعث سرکوب ایمنی ناشی از انتقال خون شوند. از جمله این فاکتورهای محلول می توان به پروتئین ۱۴ جفتی[3] اشاره نمود که علاوه بر جفت، از پلاکتها نیز آزاد شده و می‌تواند توسط مهار تکثیر سلول T ، پاسخ ایمنی گیرنده راتحت تأثیر قرار دهد [۸]. اشکال محلول و غشایی آنتی ژنهای HLA [4] و مولکول Fas Ligand هم جزئی از این آنتی ژن ها هستند. این مولکولها طی نگهداری خون از گلبولهای سفید آزاد شده و قادرند باعث ایجاد سرکوب ایمنی یا تحمل در گیرنده شوند. در زمان نگهداری فرآورده‌ها، گلبولهای سفید دچار آپوپتوز شده و با آزادسازی این فاکتورها، باعث القای سرکوب ایمنی، آنرژی سلولی و آپوپتوزیس درگیرنده می‌شوند. مقدار این مولکولها متناسب با تعداد

---

[1] Mixed Chimerism
[2] Storage
[3] Placental Protein 14/ PP14
[4] Human Leukocyte Antigens

گلبول های سفید و مدت نگهداری فرآورده می‌باشد. این موضوع در فرآورده‌های خونی کهنه تر مشهودتر است و می‌توان گفت که در فرآورده‌های تازه تر دیده نمی‌شود. غلظت این مولکولهای محلول در فرآیندهای خونی کم لکوسیت یا فاقد لکوسیت اندک بوده و در نتیجه اثرات آنها نیز کمتر می باشد. بنابراین بدیهی است که با حذف گلبولهای سفید قبل از ذخیره‌سازی، می‌توان تا حد زیادی از این اثرات کم نمود [۴و۱۲].

روند آپوپتوز در یک سلول بسیار پیچیده است و مشخص شده که عوامل زیادی در پیدایش و تنظیم آن دخیلند. در واقع فاکتورهای مختلفی در ایجاد و کنترل یک وضعیت مقاومت به آپوپتوز و یا حساسیت به آن در یک سلول ایمنی دخیلند مثل سیتوکینها، گیرنده های مرگ، میتوکندری وپروتئینهای خانواده Bcl-2 ، لیزوزومها و غیره. گیرنده های مرگ[1] در سطح سلول هدف حضور داشته و در اثر اتصال با لیگاند مکمل خود باعث تهییج آپوپتوز در آن سلول می‌شوند. از مهمترین این مولکولها می‌توان به Fas (CD95) اشاره کرد که با لیگاند خود یعنی Fas Ligand (Fas L/CD95L) بر هم کنش داده و باعث پیدایش وقایعی همچون فعالسازی کاسپازها در سلول هدف و در نهایت تجزیه DNA و مرگ آپوپتوتیک آن سلول می‌شود [۱۳و۱۴]. بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که گرانولوسیتها، مونوسیتها و سلولهای NK انسان ، محتوی Fas L داخل سلولی از قبل سنتز شده اند که متعاقب تماس با ضد انعقاد[2] ، ذخیره سازی مختصر خون (در حرارت اتاق به مدت ۶۰ دقیقه) و یا با جداسازی شان از خون کامل،آن را بیان می کند [۱۵و۱۶].

بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که در برخی از فرآورده های خونی، مدتی پس از ذخیره سازی فرآورده، تغییرات آپوپتوتیک شروع به وقوع نموده و طی آن سلول های موجود در فرآورده دچار آپوپتوزیس و سپس نکروز می شوند. از جمله این فرآورده ها می توان از واحدهای گلبول قرمز

[1] Death receptors
[2] Blood anticoagulation

متراکم و واحد های پلاکتی نام برد که طی روزهای کمی پس از ذخیره سازی آنها در سرما ، گلبولهای سفید موجود در آنها تظاهرات مشخص[1] آپوپتوز را از خود نشان می دهند. مشخص شده که تعداد زیادی ازگرانولوسیتها و سپس لنفوسیتها تحت فرآیند آپوپتوز قرار می گیرند و میزان آپوپتوزیس با افزایش مدت زمان نگهداری فرآورده پیشرفت می کند. بدین ترتیب در حالیکه انتقال خون تازه منجر به آلوایمیونیزاسیون می شود ، آسیب عملکردی و مرگ سلولهای عرضه کننده آنتی ژن[2] در طی ذخیره سازی ، توانائیشان را برای تحریک پاسخ های ایمنی سایتوتوکسیک محدود می کند و از طرف دیگر کاهش عملکرد و مرگ سلولهای T دهنده در طی ذخیره سازی ، از توسعه GVHD بدنبال انتقال خون [3]جلوگیری می نماید. همچنین ذخیره متداوم خون منجر به نکروز ثانویه لکوسیتهای آپوپتوز شده و رهاسازی آنتی ژنهای محلول از جمله soluble Fas Ligand می شود. بسته به دز[4] تزریق شده، انتقال چنین فرآورده هایی می تواند منجر به القاء سرکوب ایمنی شود [۲و۱۵و۱۷]. بدین جهت لازم است که در طب انتقال خون، به مسئله آپوپتوزیس گلبول های سفید موجود در فرآورده های خونی و مدت زمان نگاهداری آن فرآورده توجه بیشتری اعمال گردد.

با توجه به مطالب ذکر شده، هدف اصلی این تحقیق بررسی امکان توانائی خون تزریق شده در القاء مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس) در واحدهای خون نگهداری شده و تأثیر مدت نگهداری خون کامل بر این فرآیند می باشد و با توجه به نقش مولکول Fas و لیگاند آن (Fas Ligand) در القاء آپوپتوزیس، به بررسی فرم محلول Fas Ligand (soluble Fas Ligand) در واحدهای خون کامل[5] نگهداری شده و ارتباط آن با پدیده توانائی القاء آپوپتوزیس پرداخته ایم. با توجه به اینکه در زمینه TRIM، مطالعات ضد و نقیضی وجود دارد که یکی از علل عمده آن تأثیر عوامل مداخله گر در مطالعات

---

[1] Typic
[2] Antigen Presenting Cells/APCs
[3] Post Transfusion-Graft Versus Disease/PT-GVHD
[4] Dose
[5] Whole Blood

متعاقب تزریق خون می باشد به منظور محدود کردن عوامل مداخله گر به بررسی تـأثیر محلـول روئـی خون کامل در زمان های مختلف نگهداری بر القاء آپوپتوزیس در یک مـدل آزمایـشگاهی [1] و در سـلول های تک هسته ای جدا شده از خون محیطی تازه[2] و تأثیر مدت نگهـداری بـر افـزایش میـزان sFas L پرداخته ایم.

[1] In vitro model
[2] Fresh peripheral blood

۱-۲ . مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۲-۱ .تعدیل ایمنی مرتبط با انتقال خون[1]

از زمان های دور انتقال خون [2] به عنوان یک ابزار مهم درمانی توسط بشر مورد استفاده بوده و به موازات پیشرفت علم پزشکی ، اهمیت و ارزش آن برای انسان روشن تر گردیده است. اهداء خون می‌تواند به صورت اهداء خون آلوژنیک و یا اهداء خون اتولوگ انجام گیرد. انتقال خون آلوژنیک، اهداء خون به وسیله فرد به قصد اهداء آن به افراد مختلف و اهداء خون اتولوگ، اهداء خون به وسیله خود بیمار به قصد تزریق مجدد خون به خود وی می‌باشد [۱۸].

در مورد تأثیر درمانی تزریق خون شکی وجود ندارد و مانند اکثر درمان‌های مؤثر، مزایا و معایب انتقال خون مدت‌ها و در واقع قبل از شناسایی خطرهای ناشی از انتقال بیماری مشخص شده‌اند.برخی از موانع اصلی بر سر راه تزریق خون آلوژنیک و در واقع عوارض آن ماهیت ایمونولوژیک داشته‌اند. عوارض ایمونولوژیک تزریق خون (که یکی از آن‌ها واکنش‌های همولتیک ناشی از ناسازگاری ABO می‌باشد) دلیل ممنوعیت قانونی تزریق خون در دوره طولانی تاریخ نوین بخش‌هایی از اروپای غربی بوده است. با کشف گروه خونی ABO توسط لندشتاینر در سال ۱۹۰۰ تغییراتی اگر چه کند صورت گرفت اما با شناخت اصول عملکرد ایمنی هومورال نسبت به گلبول‌های قرمز آلوژنیک، تزریق خون به راه حلی نسبتاً بی خطر و مؤثر در درمان خون‌ریزی و آنمی بدل گردید [۱و۲]. موضوع‌های مرتبط با عوارض انتقال خون که در دو دهه آخر قرن بیستم متحول شدند، شامل: بیماری های منتقله از طریق تزریق خون (نظیر ایدز)، عوارض بالینی پیچیده‌تر که ناشی از اختلال در ایمنی میزبان بوده و احتمالاً می‌توانند ناشی از تزریق فرآورده‌های سلولی اهداء کننده آلوژنیک باشند، تعدیل سیستم ایمنی ناشی از تزریق خون و بیماری پیوند علیه میزبان می‌باشند. اپیدمی ایدز و تأثیر آن بر دریافت کنندگان خون کاملاً

---

[1] Transfusion Related Immunomodulation/TRIM
[2] Blood Transfusion

شناخته شده و در واقع نیروی محرک اصلی در تمام سیاست‌های بهداشت عمومی در عرصه تزریق خون بوده است. به هر حال، تعدیل سیستم ایمنی ناشی از تزریق خون هم ممکن است روزی به عنوان مشکل بهداشت عمومی به همان میزان مطرح شود و به فرصتی برای ارتقاء مراقبت‌های بیماران بدل گردد [۲۰-۱۸].

تفکر اساسی زیر بنای تئوری تعدیل سیستم ایمنی ناشی از تزریق خون در اواخر دهه ۴۰ و اوایل دهه ۵۰ به وجود آمد. پس از گذشت ربع قرن، این رویکرد به عنوان ابزار ارتقاء پیوند بالینی پذیرفته شد و تئوری تعدیل سیستم ایمنی متعاقب تزریق خون مورد پذیرش همگانی قرار گرفت [۱۵و۲۳-۲۱]. بعضی از رویدادهای مهم در تاریخ تئوری تعدیل ایمنی متعاقب تزریق خون به اختصار در زیر ذکر شده اند.

۱۹۰۰: کشف گروه خون ABO توسط لنداشتاینر و طرح ایمنی هومورال به عنوان تنها الگوی اصلی در تزریق خون

دهه ۱۹۵۰: شناسایی جایگاه ژن های مربوط به سیستم سازگاری نسجی انسانی و بازوی سلولی سیستم ایمنی و اهمیت لنفوسیت ها

دهه ۱۹۶۰: قابل قبول شدن پیوند اعضاء و مغزاستخوان با پیشرفت تکنیک های جراحی و عرضه داروهای مؤثر سرکوب کننده سیستم ایمنی

دهه ۱۹۷۰: مشخص شدن تأثیر تزریق خون آلوژنیک[1] بر بهبود پذیرش پیوند کلیه

دهه ۱۹۸۰: مشخص شدن اختلال عملکرد ایمنی سلولی در دریافت کنندگان خون آلوژنیک

۱۹۸۲: ارائه اولین گزارش در مورد ارتباط میان تزریق خون و اثر تضعیفی آن بر بیماران سرطانی

۱۹۸۵: انجام اولین آزمایش تصادفی نشان دهنده کارایی موفق تزریق آلوژنیک در تداوم حاملگی در بیماران با سقطهای ناخواسته مکرر

[1] Allogenic Blood Transfusion/ABT