

سطح میکرو RNA های mir-222 ، mir-92a و mir-223 در میکروپار تیکل های مشتق شده از پلاکت در فرآورده های پلاکتی تهیه شده به روش پلاسمای غنی از پلاکت در طول مدت ذخیره سازی

قاسم عباس زاده^۱، کامران عطاردی^۲، میرکامران موسوی حسینی^۳

چکیده

سابقه و هدف

سنجش تغییرات بیان میکرو RNA های پلاکتی، یکی از شاخص های ارزیابی ضایعات ناشی از ذخیره سازی پلاکت محسوب می شود. هدف از مطالعه، بررسی سطح تغییرات در بیان mir-223 و mir-92a و mir-222 طی دوران ذخیره سازی در پلاکت های تهیه شده به روش پلاسمای غنی از پلاکت، به عنوان شاخصی برای ارزیابی ضایعات ذخیره سازی بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، ۵ واحد کنسانتره پلاکتی تهیه شده به روش PRP از اهداکنندگان خون جمع آوری گردید و به مدت ۵ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد همراه با آژیتاسیون نگهداری شد. تغییرات در سطح بیان mir-223 ، mir-92a و mir-222 با استفاده از روش qRT-PCR طی روزهای صفر، سه و پنج ذخیره سازی اندازه گیری شد. نتایج با استفاده از نرم افزار GenEX نسخه ۷ با آزمون paired-sample t-test تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها

طی این مطالعه مشخص شد بیان mir-223 در روزهای سوم و پنجم ذخیره سازی نسبت به روز صفر افزایش یافت ($p < 0/001$). بیان mir-92a نیز در روز سوم و پنجم نسبت به روز صفر نیز افزایش معناداری را نشان داد ($p < 0/05$). از طرفی بیان mir-222 به تدریج در طول مدت زمان ذخیره سازی طی پنج روز کاهش یافت ($p < 0/05$).

نتیجه گیری

مطالعه نشان داد که تعیین پروفایل miRNA های میکروپار تیکل ها در کنسانتره های پلاکتی در کنار پارامترهای رایج مانند شمارش پلاکت ها، تعیین MPV و حجم فرآورده پلاکتی، شمارش لکوسیت ها، بررسی swirling و تعیین pH فرآورده پلاکتی می تواند ابزار مفیدی برای شناسایی آسیب های سلولی مرتبط با ضایعات ذخیره سازی پلاکت و شاخص بالقوه ای برای ارزیابی کیفیت و قابلیت زیستی پلاکت های ذخیره شده در *in vitro* باشد.

کلمات کلیدی: میکرو RNA ، پلاکت، پلاسما

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۶

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

۲- PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- مؤلف مسئول: دکترای تخصصی شیمی دارویی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق

پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

کنسانتره پلاکتی، یکی از فرآورده‌های اصلی به دست آمده از خون است. میلیون‌ها فرآورده پلاکتی در هر سال برای درمان بسیاری از بیماران مبتلا به اختلالات پلاکتی تزریق می‌شوند و زندگی بسیاری به واسطه تزریق این فرآورده‌ها به طور مستقیم متاثر می‌شود. لذا بهبود روش‌ها و استراتژی‌هایی که کیفیت فرآورده‌های خونی را ارزیابی می‌کنند، همواره مورد نیاز است تا از ایمن بودن و کارآمد بودن این فرآورده‌ها برای بیماران اطمینان حاصل گردد (۲)، (۱). در اغلب کشورها، فرآورده‌های پلاکتی در دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد همراه با آذیتاسیون به مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری می‌شوند (۳). شرایط ذخیره‌سازی و نگهداری در *in-vitro* سبب می‌شود پلاکت‌ها تحت تغییرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک قرار بگیرند. یکی از دلایل اصلی مدت زمان محدود نگهداری فرآورده‌های پلاکتی، ضایعات ناشی از ذخیره‌سازی یا PSL است که کیفیت و کارایی فرآورده‌های پلاکتی را کاهش می‌دهد (۷-۴). PSL یک رویداد پیچیده است که در آن هر دو فرآیند فعال‌سازی و آپوپتوز نقش دارند. طی دوران ذخیره‌سازی، میکروپارتیکل‌های پلاکتی به واسطه فعال‌سازی یا آپوپتوز پلاکت‌ها تولید می‌شوند و نقش مهمی را در انتقال محتویات پلاکتی از جمله میکرو RNAها و بروز عوارض نامطلوب ناشی از تزریق پلاکت ایفا می‌کنند (۱۲-۸). متعاقب تزریق فرآورده‌های پلاکتی، میکرو RNAها هم به میزبان منتقل می‌شوند که می‌تواند اهمیت بالینی به سزایی داشته باشد. برخی از میکرو RNAهای پلاکتی سبب اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال و در نتیجه اختلال در فرآیندهای تنظیم هموستاز می‌شوند. بدین ترتیب ممکن است در بروز اختلالات ترومبوتیک نیز سهمی باشند (۲۳-۱۳). تعیین پروفایل بیان این گروه از miRNAها در کنسانتره‌های پلاکتی، می‌تواند ابزار مفیدی برای شناسایی آسیب‌های سلولی مرتبط با ضایعات ذخیره‌سازی پلاکت (platelet storage defect) یا (PSL) یا (platelet storage lesion) (PSD) و شاخص بالقوه‌ای برای ارزیابی کیفیت و قابلیت زیستی پلاکت‌های ذخیره شده در شرایط *in vitro* باشد (۲۴، ۴). به علاوه ممکن است نتایج حاصل به

مدیریت عوارض نامطلوب متعاقب تزریق پلاکت‌ها و مدیریت مصرف فرآورده‌های پلاکتی کمک نماید. لذا در این مطالعه تغییرات در سطح بیان میکرو RNA های mir-92a، mir-222 و mir-223 را که متعاقب انتقال به سلول اندوتلیال موجب تغییر و تعدیل عملکرد بیولوژیک این سلول می‌شوند، طی روزهای صفر، سه و پنج ذخیره‌سازی در کنسانتره‌های پلاکتی تهیه شده به روش پلاسمای غنی از پلاکت مورد سنجش قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و ذخیره‌سازی کنسانتره‌های پلاکتی:

در این مطالعه تجربی، ۵ واحد کنسانتره پلاکتی رندوم از اهداکنندگان داوطلب خون مراجعه‌کننده به پایگاه تهران در سال ۱۳۹۷ به شکل تصادفی انتخاب شد. معیار ورود اهداکنندگان خون به مطالعه، اهداکنندگان سالمی بودند که بر اساس معیارهای تدوین شده توسط سازمان انتقال خون ایران برای انتخاب اهداکننده سالم، توسط پزشک واحد اهداکنندگان پایگاه انتقال خون تهران غربالگری شدند. طی فرآیند انتخاب، نوع و جنس کیسه‌های کنسانتره‌های پلاکتی و جنسیت، سن و گروه خونی اهداکنندگان لحاظ نگردید. کنسانتره‌های پلاکتی رندوم بلافاصله پس از تهیه و اتمام زمان استراحت (۲ ساعت در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد) مطابق با استانداردهای ملی سازمان انتقال خون ایران، تحویل گرفته شد. فرآورده‌های پلاکتی پس از تحویل از واحد آزمایشگاه فرآوری خون پایگاه تهران، به ستاد مرکزی منتقل گردید. برای انتقال این فرآورده‌ها طبق دستورالعمل سازمان انتقال خون ایران، از محفظه‌های مخصوص حمل پلاکت دارای دینالاگر استفاده شد و کنسانتره‌های پلاکتی در عرض کمتر از ۳۰ دقیقه به ستاد مرکزی انتقال یافت.

پس از انتقال و پیش از ذخیره‌سازی، به منظور کاهش لکوسیت‌ها، مهم‌ترین مداخله‌کننده در نتیجه مطالعه، کنسانتره‌های پلاکتی از فیلترهای کاهنده لکوسیت *in-line* عبور داده شدند. سپس با توزین واحدها، حجم کنسانتره‌های پلاکتی محاسبه شده و واحدهایی با *Swirling* و حجم مناسب انتخاب گردیدند. پس از انتخاب واحدهای

پلاکتی در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد به مدت پنج روز با آژیتاسیون مداوم در انکوباتور پلاکتی مرکز تحقیقات نگهداری گردید.

در این مطالعه برای مقایسه نتایج به دست آمده و محاسبه میانگین‌ها از آزمون آماری Paired sample t-test استفاده گردید. مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری مهم و قابل توجه در نظر گرفته شدند. داده‌ها وارد نرم افزار GenEx نسخه ۷ گردید و مقایسه و میانگین متغیرهای مورد نظر در روزهای صفر، سه و پنج ذخیره‌سازی در کنسانتره‌های پلاکتی تعیین شد.

فرآیند جداسازی میکروپارتیکل‌های پلاکتی:

برای حفظ استریلیتی کنسانتره‌های پلاکتی طی دوران ذخیره‌سازی، نمونه‌برداری از کورد متصل به کیسه و در زیر هود در شرایط استریل انجام گرفت. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از کنسانتره پلاکتی به لوله فالكون منتقل گردید. سپس شمارش اولیه پلاکتی با استفاده از دستگاه سل‌کانتر کالبره sysmex XS 800i (سیس‌مکس - ژاپن) روی نمونه انجام شد و واحدهایی با شمارش پلاکتی حداقل $5/5 \times 10^9$ و شمارش لکوسیتی کمتر از 0.2×10^9 و $pH \geq 6.2$ انتخاب شدند (۲۴). لوله‌های فالكون حاوی کنسانتره پلاکتی به مدت ۱۰ دقیقه در دور $200 \times g$ به منظور رسوب سلول‌ها سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی به لوله فالكون دیگری منتقل شده و مجدداً در دور $2100 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. این مرحله جهت اطمینان از رسوب کامل پلاکت‌ها و سلول‌های باقی مانده مجدداً تکرار شد. در مرحله بعد، مایع رویی حاوی پلاسما و میکروپارتیکل‌ها از رسوب سلولی ته لوله جدا شده و به لوله فالكون دیگری منتقل گردید و در نهایت در سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور $20000 \times g$ قرار داده شد. پس از خارج نمودن مایع رویی به منظور اطمینان از خروج حداکثری پروتئین‌های پلاسما، رسوب ته لوله دو مرتبه با محلول Phosphate Buffer Solution (PBS) فاقد کلسیم و منیزیم به مدت یک ساعت در دور $20000 \times g$

شستشو داده شد. این مراحل برای تمامی نمونه‌ها در طی دوران ذخیره‌سازی انجام گرفت (۲۷-۲۵، ۲۰).

تعیین سائز و هویت میکروپارتیکل‌ها:

برای تعیین سائز و اندازه میکروپارتیکل‌های جداسازی شده از روش Dynamic light scattering با حداقل ۵۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی میکروپارتیکل‌ها استفاده شد. در این تحقیق تایید و تعیین منشأ پلاکتی میکروپارتیکل‌های جداسازی شده با کمک دستگاه فلوسیتومتری Partec-PAS- CY flow III (آلمان، Partec GmbH) و آنتی‌بادی CD41 FITC با کونژوگه با آنتی‌بادی CD61 کونژوگه با FITC انجام شد. برای این منظور ۳ میکرولیتر از آنتی‌بادی مورد نظر به هر نمونه اضافه گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک انکوبه شد. گیت میکروپارتیکل‌های پلاکتی نیز بر روی forward scatter (FCS) و side angle scatter (SSC) با استفاده از calibrator beads با ابعاد $0.9 \mu m$ میکرومول، $0.5 \mu m$ میکرومول و $0.3 \mu m$ میکرومول مشخص گردید. از آنتی‌بادی IgG1-FITC به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج میکروRNA ها:

در این مطالعه از روش دستی استخراج microRNA ها استفاده گردید. به نمونه حاوی میکروپارتیکل به مقدار $500 \mu L$ محلول تریزول سرد اضافه شد. برای اطمینان از این که لیز میکروپارتیکل‌ها به طور کامل انجام می‌شود، نمونه حاوی تریزول به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید. بعد از ورتکس، نمونه برای حدود ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. در طی این مدت نوکلئوپروتئین‌ها کاملاً تجزیه می‌شوند. در مرحله بعد $100 \mu L$ کلروفرم به نمونه افزوده شد و نمونه به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط گردید. در ادامه به مدت ۲-۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور $12000 \times g$ سانتریفیوژ گردید با اتمام سانتریفیوژ، سه فاز در لوله نمونه تشکیل می‌شود. فاز قرمز فنول - کلروفرم در ته لوله، یک فاز میانی و یک فاز

دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱: مواد و مقادیر استفاده شده در ساخت cDNA از miRNA

مواد و مقادیر استفاده شده در مرحله اول ساخت cDNA از miRNA	
غلظت نهایی در محیط	ماده
۱-۵ µg	total RNA
۱/۰ µg	BON-RT adaptor
Up to ۱۲ µg	RNase free water
مواد و مقادیر استفاده شده در مرحله دوم ساخت cDNA از miRNA	
غلظت نهایی در محیط	ماده
۱ µL	RT enzyme
۲ µL	dNTP
۴ µL	RT buffer
To bring final volume to ۲۰ µL	RNase free water

برای تعیین بیان نسبی miRNA های انتخابی، از Quantitative Real Time PCR استفاده شد. مقدار cDNA استفاده شده ۱ میکرولیتر و مقدار هر کدام از آغازگرهای اختصاصی و عمومی برای miRNA های انتخابی ۰/۵ میکرولیتر بود. برنامه PCR استفاده شده برای بیان ژن miRNA به ترتیب عبارت بود از: دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و یک چرخه که با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه ادامه یافت. تکثیر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۰ چرخه انجام شد. در مطالعه حاضر از snRNA U6 جهت طبیعی سازی نتایج qRT-PCR استفاده گردید (جدول ۲) (شکل های ۱، ۲ و ۳).

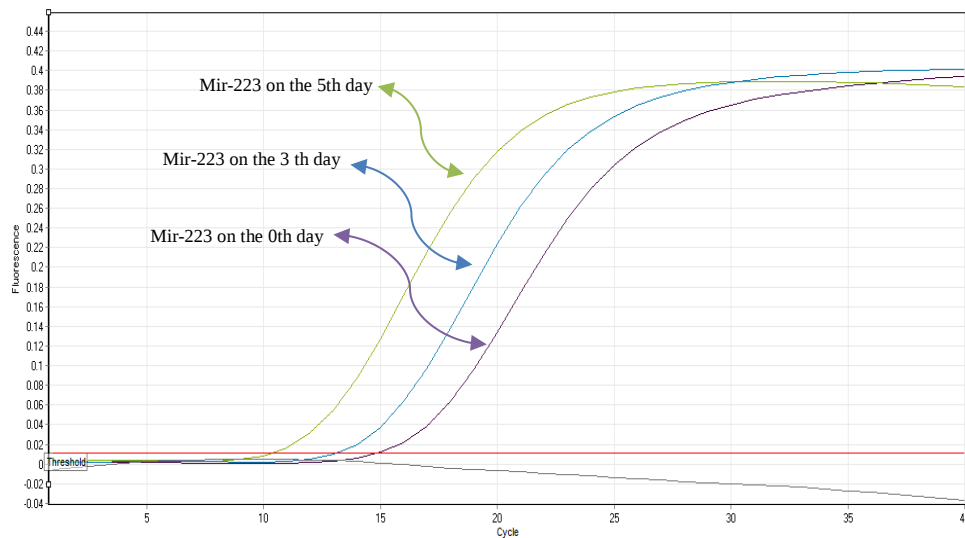
جدول ۲: مواد و مقادیر استفاده شده در qRT-PCR

غلظت نهایی در محیط	ماده
۱ µg	cDNA
۰/۵ µL	miRNA-specific forward primer
۰/۵ µL	Universal revers primer
۶/۵ µL	miRNA QPCR master mix
Up to ۱۳ µL	Nuclease-free, PCR-grade H2O

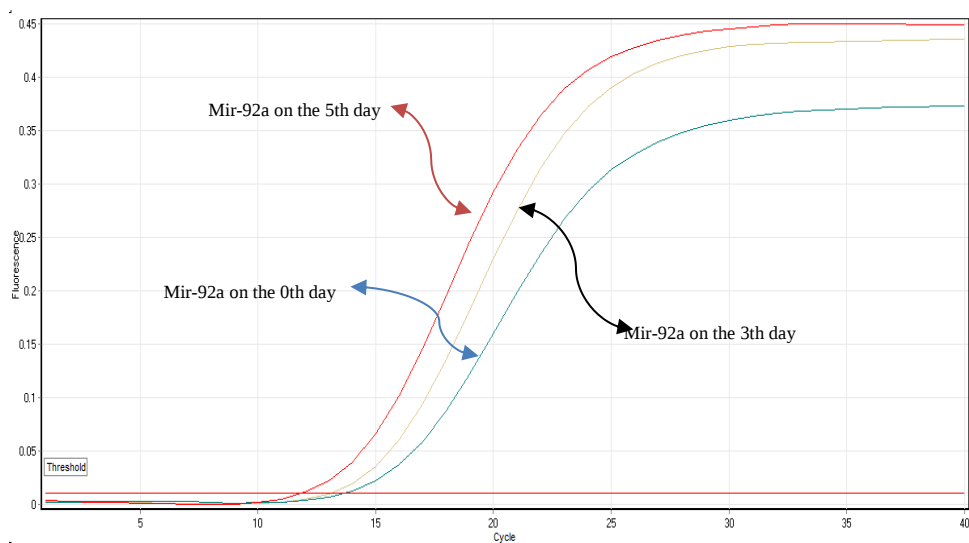
آبی بی رنگ در بالای لوله. فاز رویی آبی بی رنگ حاوی RNA می باشد که با دقت با استفاده از سمپلر و در زاویه ۴۵ درجه به میکروتیوب RNase free منتقل گردید. از آن جایی که مقدار RNA پلاکت بسیار ناچیز است، لذا برای رسوب بهینه به مایع حاصل از مرحله قبل، ۵ µL گلیکوژن اضافه گردید و نمونه به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از اتمام دوره انکوباسیون، به مقدار ۵۰۰ µL الکل اتانول مطلق سرد افزوده شد و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. در این مرحله حتی قبل از سانتریفیوژ، پلت ژل مانند RNA در ته لوله قابل مشاهده است. سپس در دور ۱۲۰۰۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ انجام گرفت و مایع رویی خارج گردید. به منظور شستشوی پلت RNA در ته میکروتیوب، از ۵۰۰ µL الکل اتانول ۷۰٪ سرد استفاده شد. بعد از افزودن الکل اتانول سرد، میکروتیوب برای ۱۰ دقیقه در دور ۸۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سپس با اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی خارج گردید. در نهایت بعد از آخرین مرحله شستشو، پلت RNA ته میکروتیوب به منظور خارج شدن باقی مانده الکل در دمای اتاق به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار گرفت. در این مرحله بایستی دقت داشت تا پلت ته میکروتیوب کامل خشک نشود. بعد از این مدت در حدود ۲۰ تا ۵ میکرولیتر آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (diethyl pyro carbonate : DEPC) به میکروتیوب اضافه کرده و آن را در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان ساخت cDNA نگهداری نمودیم (۲۸).

ساخت cDNA و بررسی آنالیز بیان miRNA با Quantitative Real Time PCR

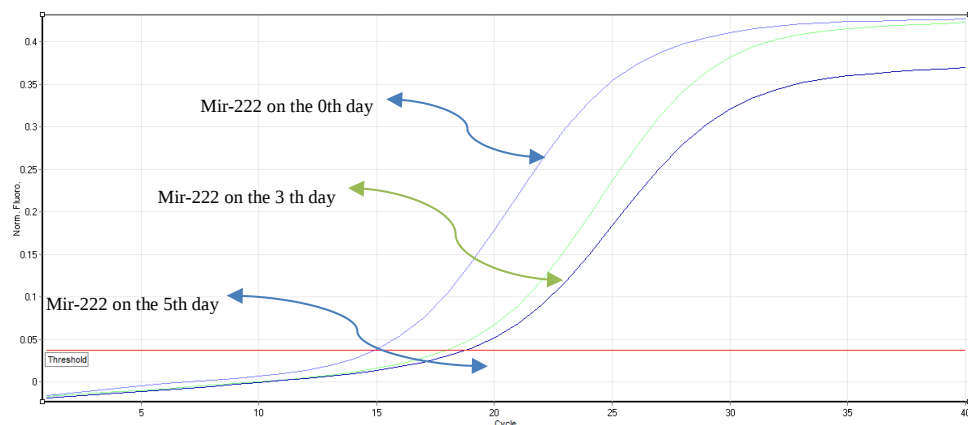
پس از استخراج RNA و اندازه گیری غلظت آن با دستگاه نانودراپ، cDNA مربوط به هر miRNA با استفاده از کیت (بن یاخته، ایران) ساخته شد. ساخت cDNA شامل دو مرحله بود. در مرحله اول واکنش poly A polymerase طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت و در مرحله دوم ساخت cDNA پس از افزودن ترکیبات لازم به همراه آنزیم RT طبق



شکل ۱: نمونه‌ای از منحنی Real Time PCR برای mir-223 طی روزهای صفر، سوم و پنجم ذخیره‌سازی



شکل ۲: نمونه‌ای از منحنی Real Time PCR برای mir-92a طی روزهای صفر، سوم و پنجم ذخیره‌سازی



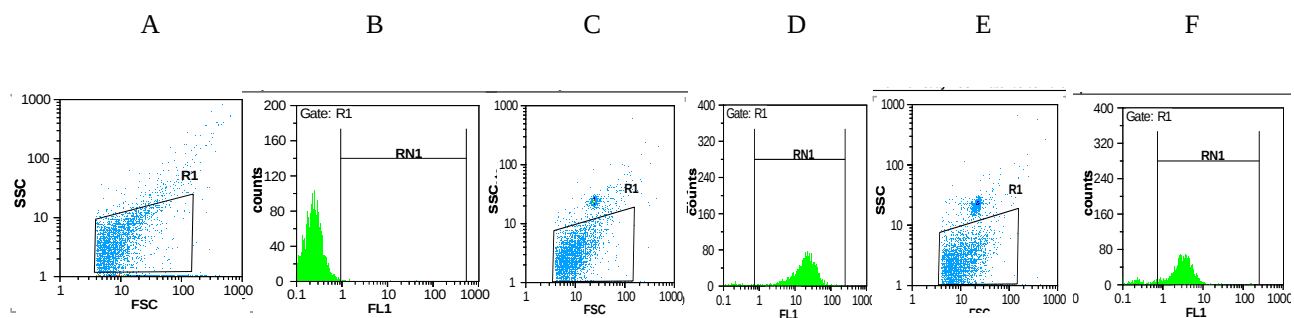
شکل ۳: منحنی Real Time PCR برای mir-222 طی روزهای صفر، سوم و پنجم ذخیره‌سازی

به علاوه نتایج حاصل از رنگ آمیزی میکروپارتیکل های مذکور برای شاخص سطحی CD61 با استفاده از anti-CD61-FITC نیز مشخص کرد که تقریباً ۸۸٪ از وقایع شمارش شده برای شاخص سطحی CD61 مثبت بودند. آنالیز یافته های DLS برای ارزیابی اندازه میکروپارتیکل های استخراج شده طی دوران ذخیره سازی نیز نشان داد که میانگین توزیع اندازه بیش از ۹۵٪ ذرات استخراج شده بین ۱-۰/۱ μm می باشند. به علاوه شدت تفرق نور که متناسب با ابعاد ذرات می باشد، طی دوران ذخیره سازی افزایش می یابد. نتایج حاصل از ارزیابی با روش های فلوسیتومتری و DLS بیانگر مطلوب بودن روش استفاده شده برای استخراج میکروپارتیکل ها بود (شکل های ۴ و ۵).

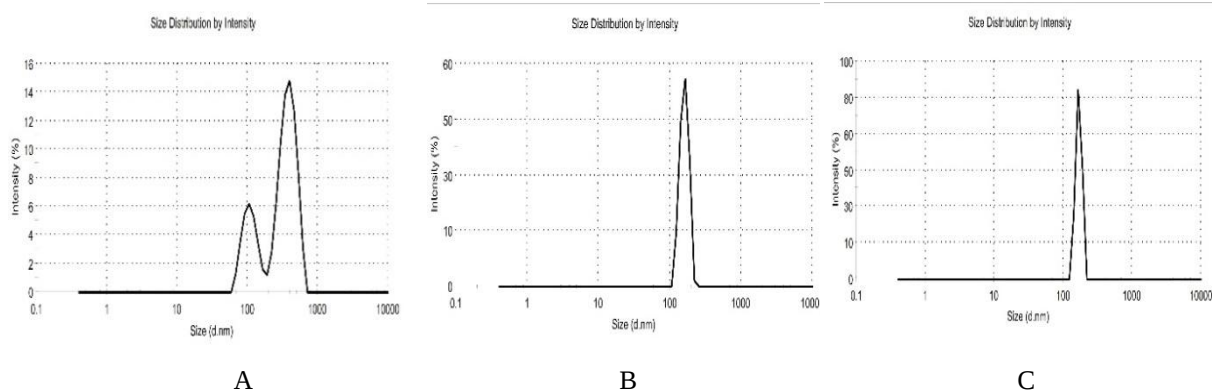
پس از انجام واکنش های qRT-PCR، تغییرات بیان miRNA های مورد مطالعه با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ به کمک نرم افزار GenEX نسخه ۷ مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت (۲۸).

یافته ها

نتایج فلوسیتومتری و DLS برای ارزیابی میکروپارتیکل ها: نتایج حاصل از ارزیابی میکروپارتیکل های جدا شده از کنسانتره های پلاکتی در طی روزهای صفر، سه و پنج ذخیره سازی با روش فلوسیتومتری، نشان داد که قریب به ۹۰٪ از وقایع شمارش شده برای رنگ آمیزی شاخص سطحی CD40 با استفاده از anti-CD40-FITC مثبت بودند.



شکل ۴: نمونه ای از نتایج فلوسیتومتری به روز شاخص های سطحی CD61 و CD41 بر سطح میکروپارتیکل های پلاکتی: به ترتیب A و B مربوط به ایزوتیپ کنترل IgG، C و D نمودار Gating و هیستوگرام شاخص سطحی CD41 رنگ آمیزی شده با anti-CD41-FITC. E و F نمودار Gating و هیستوگرام شاخص سطحی CD61 رنگ آمیزی شده با anti-CD61-FITC



شکل ۵: نمونه ای از نمودارهای توزیع اندازه ذرات برحسب شدت نور متفرق شده با استفاده از روش DLS به ترتیب A) میانگین توزیع اندازه میکروپارتیکل ها در روز صفر ذخیره سازی. B) میانگین توزیع اندازه میکروپارتیکل ها در روز سه ذخیره سازی. C) میانگین توزیع اندازه میکروپارتیکل ها در روز پنج ذخیره سازی.

نتایج حاصل از تعیین سطح بیان میکرو RNA های انتخابی با استفاده از qRT-PCR:

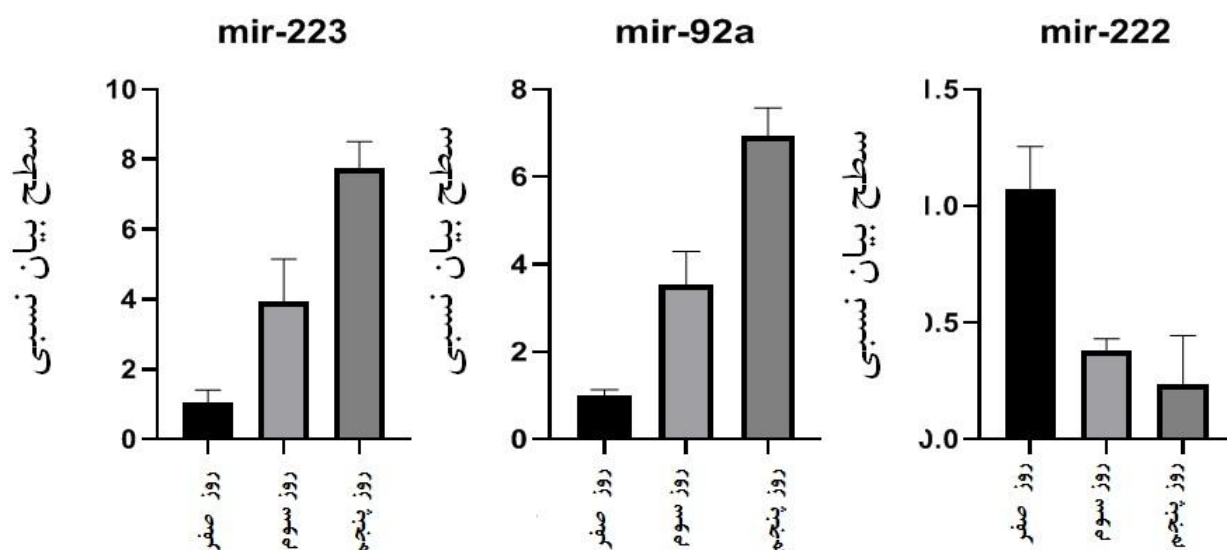
در این مطالعه با ارزیابی تغییرات در بیان miRNA-223 در میکروپارتیکل‌های ۵ واحد کنسانتره پلاکتی طی روزهای صفر، سه و پنج، مشخص شد که در روز سوم ذخیره‌سازی نسبت به روز صفر، بیان میکرو RNA مورد نظر به طور چشمگیری افزایش یافت ($p < 0.001$). این افزایش در روز پنجم نسبت به روز صفر نیز مشاهده شد. به گونه‌ای که میانگین تغییرات بیان mir-223 در روز پنجم در

مقایسه با روز صفر حدود ۴ برابر افزایش بیان را نشان داد ($p < 0.001$). افزایش بیان این میکرو RNA در روز پنجم ذخیره‌سازی نسبت به روز سوم نیز معنادار بود ($p < 0.05$). (جدول ۳) (شکل ۶).

به علاوه در این مطالعه مشخص شد که تغییرات قابل توجهی در سطح بیان mir-92a متعاقب ذخیره‌سازی در شرایط *in-vivo* طی روزهای صفر، سه و پنج رخ می‌دهد. بیان mir-92a نیز در روز سوم ($p < 0.05$) و پنجم ($p < 0.05$) نسبت به روز صفر افزایش مشخصی را نشان داد.

جدول ۳: تغییرات بیان میکرو RNA های مورد مطالعه طی روزهای مختلف ذخیره‌سازی با استفاده از نتایج qRT-PCR

Micro RNA ID	روز سوم در مقایسه با روز صفر		روز پنجم در مقایسه با روز صفر		روز پنجم در مقایسه با روز سوم	
	p value	Log2Fold change (%۹۵ CI)	p value	Log2Fold change (%۹۵ CI)	p value	Log2Fold change (%۹۵ CI)
mir-223	< 0.001	$3/78 (1/2-2/6307)$	< 0.001	$4/69 (1/23-3/23)$	< 0.001	$1/84 (0/69-1/32)$
mir-92a	0.043	$1/58 (0/42-1/05)$	0.018	$2/51 (0/13-1/07)$	0.043	$1/83 (0/35-0/45)$
mir-222	0.031	$-1/86 (1/96-5/46)$	0.041	$-2/37 (0/80-3/29)$	0.043	$-0/52 (4/09-3/086)$



شکل ۶: تغییرات پروفایل microRNA های انتخابی طی روزهای صفر، سه و پنج ذخیره‌سازی با qRT-PCR: اطلاعات ارائه شده بر مبنای انحراف معیار $\pm$ میانگین

فعال سازی و آپوپتوز نقش دارند و در پاسخ به تغییرات و محرک های محیطی، بیان شان تغییر می کند تا پاسخ مناسب پلاکتی را تنظیم نمایند (۳۶-۳۴، ۱۰). بنابراین miRNA ها، نقشی حیاتی در بیولوژی پلاکت ها طی شرایط ذخیره سازی ایفا می کنند (۲۴). مهم تر این که پلاکت ها قادرند متعاقب فعال سازی، حداقل بخشی از miRNA های خود را در میکروپارتیکل های پلاکتی (PMP) منتشر کنند و بدین ترتیب عملکرد سلول های دریافت کننده را تحت تاثیر قرار بدهند (۳۷).

لافونت و همکاران نشان دادند که PMP ها به عنوان حاملین بین سلولی برای انتقال مجموعه Ago2-microRNA عمل می کنند و بدین ترتیب بیان سلولی ژن ها و عوامل اپی ژنتیک در سلول های گردش خون، به ویژه سلول های اندوتلیال را تعدیل و تنظیم می نمایند (۲۰). تحقیقات در مورد این که چگونه miRNA، بیان mRNA پلاکتی را تنظیم می کنند و چه تاثیری بر روی سایر سلول های هدف متعاقب تزریق فرآورده های پلاکتی اعمال می نمایند، برای درک بیشتر ما از مکانیسم های مولکولار ضایعات نگهداری پلاکت ها و ارزیابی بیولوژی پلاکت ها در طی ذخیره سازی و کاهش عوارض نامطلوب متعاقب ترانسفیوژن و مدیریت ذخایر فرآورده های پلاکتی در بانک های خون ارزشمند است (۲۴، ۴). از طرفی دیگر، درک این مکانیسم های مولکولار می تواند در بهبود کیفیت و افزایش طول عمر نگهداری پلاکت ها نقش به سزایی داشته باشد (۲۴، ۹). با وجود مطالعه های گسترده در مورد میکروپارتیکل های پلاکتی و نقش آن ها در ضایعات ذخیره سازی پلاکت، اما گزارش ها و مطالعه ها در مورد محتوی میکرو RNA ای آن ها محدود می باشند. امروزه تعامل بین میکروپارتیکل های پلاکتی و miRNA های پلاکتی کاملاً مشخص شده است به طوری که mir-223 و mir-126 فراوان ترین mir های موجود در میکروپارتیکل های پلاکتی محسوب می شوند (۳۸).

در مطالعه حاضر بیان mir-222، mir-92a و mir-223 در روزهای صفر، سه و پنج ذخیره سازی در میکروپارتیکل های استخراج شده از کنسانتره های پلاکتی تهیه شده به روش پلاسما غنی از پلاکت با استفاده از

تجزیه و تحلیل داده های حاصل از qRT-PCR برای سنجش تغییرات در پروفایل mir-222، روند کاهشی در بیان میکرو RNA مذکور را نشان داد. به گونه ای که بیان mir-222 به تدریج در طول مدت زمان ذخیره سازی طی پنج روز کاهش می یابد ($p < 0.05$). در روز پنجم ذخیره سازی، کاهش بیان این میکرو RNA به حدود ۲ برابر در مقایسه با سطح بیان آن در روز صفر می رسد. میزان بیان این میکرو RNA در روز سوم نسبت به روز صفر کاهش معناداری را نشان داد (جدول ۳) (شکل ۶) ($p < 0.05$).

بحث

در این مطالعه تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از qRT-PCR برای تعیین تغییرات در سطح بیان میکرو RNA های mir-222، mir-92a، mir-233 در کنسانتره های پلاکتی تهیه شده به روش پلاسما غنی از پلاکت طی روزهای صفر، سه و پنج نگهداری در شرایط *in-vitro*، مشخص کرد که پروفایل بیان میکرو RNA های انتخابی طی دوران ذخیره سازی، دستخوش نوسانات معناداری می شود. پلاکت ها میزبان ترانسکریپتوم متنوعی (تقریباً $10^5 \times 2$ گرم در هر پلاکت) می باشند که از تقریباً ۹۵۰۰ RNA پیامبر (mRNA) و کلاس های متفاوتی از RNA های کوچک غیر کدکننده تشکیل می شوند. پلاکت ها این متریال های ژنتیکی را نیز از سلول اجدادی شان، مگاکاریوسیت، نگه می دارند. تقریباً ۸۰٪ از این RNA های کوچک غیر کدکننده، از نوع میکرو RNA هستند. میکرو RNA ها، RNA های کوچک غیر کدکننده به طول ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید می باشند که به طور اندوژنوس بیان شده و در تنظیم پس از رونویسی بیان ژن به طور منفی دخیل هستند (۳۱-۲۹، ۹، ۶). امروزه از ارزیابی میکرو RNA های پلاکتی، فراتر از نقش بیولوژیک شان در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک، به عنوان بیومارکرهایی برای تشخیص، پیگیری و کنترل بیماری های مختلف به طور گسترده ای استفاده می شود (۳۳-۳۰، ۲۴). بر مبنای گزارشی از تحقیقات پیشین، میکرو RNA های محدودی به عنوان بیومارکرهای کیفی برای ارزیابی ضایعات ناشی از ذخیره سازی پلاکت مورد استفاده قرار گرفته اند. اغلب این میکرو RNA ها در ارتباط با تنظیم فرآیندهای دخیل در

روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. الگوی بیان سه microRNA مورد مطالعه در طی روزهای صفر، سه و پنج ذخیره‌سازی به طور قابل ملاحظه‌ای تغییر یافت. بدین ترتیب که بیان mir-223 در طی دوران ذخیره‌سازی روندی افزایشی را نشان می‌دهد. به گونه‌ای که بیان این میکرو RNA در روز سوم ذخیره‌سازی نسبت به روز صفر، به طور قابل چشمگیری افزایش یافت. این افزایش در روز پنجم نسبت به روز صفر نیز مشاهده شد. افزایش بیان این mir در روز پنجم ذخیره‌سازی نسبت به روز سوم نیز معنادار بود. نتایج به دست آمده در مطالعه ما مشابه نتایج تحقیق ژاهو یوان و همکاران در سال ۲۰۱۸ می‌باشد. آن‌ها نیز افزایش بیان mir-223 در فرآورده‌های پلاکتی طی مدت ذخیره‌سازی را نشان دادند. به علاوه آن‌ها با استفاده از روش فلوسیتومتری، تاثیر تنظیمی mir-223 بر روی پروتئین‌های مرتبط و فعال‌سازی گیرنده P2Y₁₂ را اثبات کردند. طی مطالعه آن‌ها مشخص شد که mir-21 طی دوران ذخیره‌سازی، دچار تنظیم کاهشی می‌شود. P2Y₁₂، که نقش مهمی در فعال‌سازی و تجمع پلاکت‌ها ایفا می‌کند، می‌تواند GP IIb/IIIa را با تنظیم مسیر سیگنالینگ اگریگیشن فعال کند. لذا تصور کردند که miR-223 و miR-21 عملکرد گلیکوپروتئین GPIIb/IIIa را با تنظیم P2Y₁₂ تحت تأثیر قرار می‌دهند (۳۵). بنابراین افزایش بیان mir-223 طی دوران ذخیره‌سازی، با کاهش قابلیت زیستی و کیفیت کنسانتره‌های پلاکتی مرتبط می‌باشد. به علاوه مشخص شده است که میکروپارتیکل‌های پلاکتی حاوی microRNA-223 به طور ترجیحی توسط سلول‌های اندوتلیال برداشت می‌شوند (۲۰). یی‌پان و همکارانش گزارش کردند که microRNA-223 دریافت شده از پلاکت‌ها سبب افزایش محصولات انتهایی گلیکاسیون القاکننده آپوپتوز از طریق هدف‌گیری گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-1R) در سلول پذیرنده می‌گردد و به واسطه مهار بیان IGF-1R، آپوپتوز را در سلول‌های اندوتلیال عروق القا می‌کند (۱۷، ۱۸).

نقش microRNA-223 مشتق شده از میکروپارتیکل‌های پلاکتی در تنظیم بیان دو ژن داخلی سلول اندوتلیال؛

FBXW7 و Ephrin-A1؛ و ژن EFNA1 در هر دو سطح mRNA و پروتئین اثبات شده است (۲۰). افزایش بیان mirRNA-223 سبب کاهش سطح FBXW7 mRNA و افزایش سطح و فعالیت cyclin E می‌شود. افزایش بیان pre-mir223، پرولیفراسیون، مهاجرت و جوانه‌زنی و تشکیل tube (یکی از مراحل آنژیوژنز) القا شده توسط فاکتورهای رشد VEGF و bFGF سلول‌های اندوتلیال طی فرآیند آنژیوژنز را مهار می‌کند. mir-223 نه تنها بر روی فعال‌سازی ERK1/2 القاء شده توسط فاکتور رشد اثر می‌گذارد بلکه با کاهش تنظیمی بیان B1-ایتنگرین در سلول‌های اندوتلیال، سبب مهار فسفوریلاسیون گیرنده‌های VEGFR2 و FGFR1 القا شده توسط فاکتورهای رشد VEGF و bFGF و هم چنین مهار فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Akt نیز می‌گردد (۳۹). علاوه بر این، فاکتور RhoB نیز به عنوان یکی از اهداف mir-223 محسوب می‌شود که متعاقب افزایش بیان mir-223 سطح آن کاهش یافته و این امر موجب مهار آنژیوژنز می‌گردد (۴۰). علاوه بر این، افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی فرآورده‌های پلاکتی، باعث کاهش سطح بیان miR-21 و miR-155 در روز ۵ و به دنبال آن افزایش miR-223، miR-3162 و 1et-7b می‌شود که مستقیماً روی تجمع پلاکتی و به تبع آن PSL تاثیرگذار است (۴۱).

طی مطالعه حاضر بیان mir-92a در میکروپارتیکل‌های پلاکتی طی روزهای سوم و پنجم نسبت به روز صفر، با افزایش معناداری همراه بود. به علاوه این روند افزایشی در بیان طی روز سوم نسبت به روز پنجم نیز مشاهده شد. افزایش بیان mir-92a در مطالعه دیگری که بیان miRNA پلاکتی در ۱۰۰ کنسانتره پلاکتی تهیه شده به روش بافی‌کوت را بررسی کرده بود نیز ذکر شده است. پونتس و همکاران تغییرات در بیان ۱۰ microRNA با فراوانی بالا را در ۱۰۰ کنسانتره پلاکتی طی روزهای ۱ تا ۷ ذخیره‌سازی با استفاده از روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار دادند. طی مطالعه‌های وی نیز مشخص شد که تا روز پنجم ذخیره‌سازی نیز بیان mir-92a افزایش می‌یابد (۴۲). ژن‌های متعددی توسط این mir تنظیم می‌شوند. mir-92a در تنظیم

مرتبط با پیری توسط آنزیم‌های ویرایش‌کننده RNA به miRNA های بالغ تبدیل می‌شوند. طی این فرآیند پیش‌سازهای miRNA و هم چنین برخی از رونوشت‌های اولیه RNA می‌توانند به مولکول‌های RNA کوچکتر شکسته شوند که ممکن است نقش سرکوب‌کنندگی در فرآیند ترجمه ایفا نمایند (۴۵، ۴۴، ۳۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مطالعه‌های پیشین پیشنهاد می‌گردد که کنسانتره‌های پلاکتی که مدت زمان طولانی‌تری در شرایط *in-vitro* ذخیره می‌شوند، با احتیاط بیشتری برای بیماران مستعد وقایع ترومبوتیک استفاده شوند. به علاوه تعیین پروفایل میکروRNA های میکروپارتیکل‌های پلاکتی در کنار شاخص‌ها و پارامترهای رایج مانند: شمارش پلاکت‌ها، تعیین میانگین حجم پلاکتی (MPV)، تعیین حجم فرآورده‌های پلاکتی، شمارش لکوسیت‌ها، بررسی swirling و تعیین pH فرآورده پلاکتی می‌تواند ابزار مفیدی برای کنترل کیفی و ارزیابی ضایعات ناشی از ذخیره‌سازی فرآورده‌های پلاکتی محسوب شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات کلیه همکاران محترم پایگاه انتقال خون بابل و تهران، همکاران بخش بانک خون بند ناف و مرکز نوآوری‌های ستاد مرکزی و به ویژه از استاد گرانقدر آقای سمیعی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند صمیمانه سپاسگزاریم. این مقاله منتج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1397.023 می‌باشد. بدین وسیله از زحمات این بزرگواران نیز تقدیر و تشکر می‌شود.

بیان KLF2 و KLF4 در اندوتلیوم عروق مشارکت داشته و با فنوتیپ هتروژنیک پرو-آتروژنیک مرتبط است (۴۳). فانگ و همکارانش دریافتند که mir-92a هم در سطح رونویسی و هم در سطح ترجمه، هر دو فاکتور KLF2 و KLF4 را مهار می‌کند (۱۳). خاویر لویز و همکارانش مشخص کردند که mir-92a به عنوان athero-mir طی فرآیند آترواسکلروز دچار افزایش تنظیمی می‌شود. به علاوه آن‌ها نشان دادند که مهار mir-92a در *in vivo*، گسترش پلاک آترواسکلروتیک، التهاب سلول‌های اندوتلیال و اتصال مونوسیت‌ها به سلول‌های اندوتلیوم را محدود و مهار می‌کند (۲۹). برخلاف mir-92a و mir-223، طی مطالعه ما مشخص شد که بیان mir-222 به تدریج در طول مدت زمان ذخیره‌سازی طی پنج روز روندی کاهشی را طی می‌کند. میزان کاهش بیان این mir در روز سوم نسبت به روز صفر نیز مشاهده شد. تغییرات فیزیولوژیکی پلاکت‌ها با هر دوی کاهش و افزایش تعداد miRNA ها در حین دوران ذخیره‌سازی مرتبط هستند. در طی فرآیند ذخیره‌سازی پلاکت‌ها در بانک‌های خون، کاهش فراوانی miRNA ممکن است به دلیل استرس شار، تخریب توسط نوکلئازها، فعال شدن و آپوپتوز پلاکت‌ها، که از دلایل عمده ریلیز و زیکول‌های خارج سلولی حاوی miRNA هستند و عوامل متعدد دیگری باشد. در کنار این عوامل، بایستی استرس ناشی از فرآیند پیری را نیز اضافه کرد. احتمالاً، تغییرات پس از رونویسی ممکن است بیورنر miRNA و دوام آن‌ها را در زمان ذخیره‌سازی در شرایط *ex-vivo* تحت تأثیر قرار دهد. از طرفی دیگر، افزایش mir های بسته‌بندی شده در میکروپارتیکل‌ها نیز ممکن است بیانگر تشدید فرآیند PSL باشد. به علاوه می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن پروسه‌ها و مکانیسم‌های دخیل در فرآیند بلوغ آن‌ها باشد. برای نمونه پیش‌سازهای miRNA

References:

- 1- Pontes TB, Moreira-Nunes Cde F, Maues JH, Lamarao LM, de Lemos JA, Montenegro RC, *et al.* The miRNA Profile of Platelets Stored in a Blood Bank and Its Relation to Cellular Damage from Storage. *PLoS One* 2015; 10(6): e0129399.
- 2- Holme S. Storage and Quality Assessment of Platelets. *Vox Sang* 1998; 74 Suppl 2: 207-16.
- 3- Brecher M. Technical Manual. 15th ed. Bethesda: AABB; 2005. p. 172-5.
- 4- Árnason N, Sigurjónsson Ó. New strategies to understand platelet storage lesion. *ISBT Sci Ser* 2017; 12(4): 496-500.
- 5- Ohto H, Nollert KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2011; 44(3): 321-5.
- 6- Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009; 41(2): 105-13.
- 7- Thon JN, Schubert P, Devine DV. Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. *Transfus Med Rev* 2008; 22(4): 268-79.
- 8- Yaghoubi R, Shamsasanjan K, Karimi G, Zadsar M. Evaluation of the quality of platelet components in Azarbaijan Sharghi Province: the comparison in the PSL between a blood center and a hospital. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2017; 14(4): 261-71. [Article in Farsi]
- 9- Dahiya N, Sarachana T, Vu L, Becker KG, Wood WH 3rd, Zhang Y, *et al.* Platelet MicroRNAs: An Overview. *Transfus Med Rev* 2015; 29(4): 215-9.
- 10- Yu S, Deng G, Qian D, Xie Z, Sun H, Huang D, *et al.* Detection of apoptosis-associated microRNA in human apheresis platelets during storage by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Blood Transfus* 2014; 12(4): 541-7.
- 11- Sahler J, Grimshaw K, Spinelli SL, Refaai MA, Phipps RP, Blumberg N. Platelet storage and transfusions: new concerns associated with an old therapy. *Drug Discov Today Dis Mech* 2011; 8(1-2): e9-e14.
- 12- Osman A, Falker K. Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets* 2011; 22(6): 433-41.
- 13- Gao J, Ma X, Zhang Y, Guo M, Shi D. The role of microRNAs in prethrombotic status associated with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2017; 117(3): 429-36.
- 14- Li J, Tan M, Xiang Q, Zhou Z, Yan H. Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 via microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response. *Thromb Res* 2017; 154: 96-105.
- 15- Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(5): 657-66.
- 16- Elgheznawy A, Fleming I. Platelet-enriched microRNAs and cardiovascular homeostasis. *Antioxidants & redox signaling* 2017; 29(9): 902-21.
- 17- McManus DD, Freedman JE. MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2015; 12(12): 711-7.
- 18- Pan Y, Liang H, Liu H, Li D, Chen X, Li L, *et al.* Platelet-secreted microRNA-223 promotes endothelial cell apoptosis induced by advanced glycation end products via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *J Immunol* 2014; 192(1): 437-46.
- 19- Gidlof O, van der Brug M, Ohman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, *et al.* Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood* 2013; 121(19): 3908-17, S1-26.
- 20- Laffont B, Corduan A, Ple H, Duchez AC, Cloutier N, Boillard E, *et al.* Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* 2013; 122(2): 253-61.
- 21- Provost P. Platelet microRNAs A2. Michelson A. Platelets. 3rd ed. Boston: Academic Press; 2013. p. 91-101.
- 22- Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res* 2013; 100(1): 7-18.
- 23- Chen LJ, Lim SH, Yeh YT, Lien SC, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci* 2012; 19(1): 79.
- 24- Yan Y, Zhang J, Zhang Q, Chen Y, Zhu X, Xia R. The role of microRNAs in platelet biology during storage. *Transfus Apher Sci* 2017; 56(2): 147-50.
- 25- Chandler WL. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24(2): 125-32.
- 26- Zwicker JJ, Lacroix R, Dignat-George F, Furie BC, Furie B. Measurement of platelet microparticles. *Methods Mol Biol* 2012; 788: 127-39.
- 27- Xie RF, Hu P, Li W, Ren YN, Yang J, Yang YM, *et al.* The effect of platelet-derived microparticles in stored apheresis platelet concentrates on polymorphonuclear leucocyte respiratory burst. *Vox Sang* 2014; 106(3): 234-41.
- 28- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.
- 29- Lindsay CR, Edelstein LC. MicroRNAs in Platelet Physiology and Function. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(3): 215-22.
- 30- Dangwal S, Thum T. MicroRNAs in platelet biogenesis and function. *Thromb Haemost* 2012; 108(4): 599-604.
- 31- Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(9): 961-6.
- 32- Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang* 2010; 99(2): 112-22.
- 33- Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets* 2008; 19(6): 395-404.
- 34- Maués JHDS, Aquino Moreira-Nunes CF, Rodriguez Burbano RM. MicroRNAs as a Potential Quality

- Measurement Tool of Platelet Concentrate Stored in Blood Banks-A Review. *Cells* 2019; 8(10): 1256.
- 35- Yuan Z, Wu Q, Chen X, Wei Y. Altered microRNA expression profiles are involved in Storage Lesions of Apheresis Platelet. *BioRxiv* 2018: 386011.
 - 36- Camaioni C, Gustapane M, Cialdella P, Della Bona R, Biasucci LM. Microparticles and microRNAs: new players in the complex field of coagulation. *Intern Emerg Med* 2013; 8(4): 291-6.
 - 37- Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar AA, Edelstein LC, Ma L, *et al.* Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood* 2011; 117(19): 5189-97.
 - 38- Vasina E, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR. Platelets and platelet-derived microparticles in vascular inflammatory disease. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010; 9(5): 346-54.
 - 39- Shi L, Fisslthaler B, Zippel N, Frömel T, Hu J, Elgheznawy A, *et al.* MicroRNAs-223 antagonises angiogenesis by targeting $\beta 1$ integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res* 2013; 113(12): 1320-30.
 - 40- Sun G, Li H, Rossi JJ. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3' UTR. *Nucleic Acids Res* 2009; 38(1): 239-52.
 - 41- Turner V, Mitchell S, Kang S, Hawker R. A comparative study of platelets stored in polyvinyl chloride containers plasticised with butyryl trihexyl citrate or triethylhexyl trimellitate. *Vox Sang* 1995; 69(3): 195-200.
 - 42- Pontes TB, Moreira-Nunes CdFA, da Silva Maués JH, Lamarão LM, de Lemos JAR, Montenegro RC, *et al.* The miRNA profile of platelets stored in a blood bank and its relation to cellular damage from storage. *PLoS One* 2015; 10(6): e0129399.
 - 43- Fang Y, Davies PF. Site-specific microRNA-92a regulation of Krüppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(4): 979-87.
 - 44- Mukai N, Nakayama Y, Ishi S, Murakami T, Ogawa S, Kageyama K, *et al.* Cold storage conditions modify microRNA expressions for platelet transfusion. *PLoS One* 2019; 14(7): e0218797.
 - 45- Cox D, Pontes TB, Moreira-Nunes CdFA, Maués JHdS, Lamarão LM, de Lemos JAR, *et al.* The miRNA Profile of Platelets Stored in a Blood Bank and Its Relation to Cellular Damage from Storage. *PLoS One* 2015; 10(6): e0129399.

Original Article

Evaluation of microRNAs; mir223, mir222 and mir92a levels in the Platelet-derived microparticles in the Platelet concentrates produced by Platelet Rich Plasma method during storage

Abbaszadeh G.¹, Atarodi K.¹, Mousavi Hosseini K.¹

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

Abstract

Background and Objectives

Platelets release microparticles containing cellular components, including microRNAs, during storage. Assessment of these microRNAs is one of the markers for evaluation of platelet storage lesions. The aim of the present study was to evaluate the level of changes in the expression of mir-223, mir-92a and mir-222 during storage in platelets prepared by platelet rich plasma method.

Materials and Methods

In this experimental study, 5 platelet concentrates prepared by PRP method were collected from blood donors and stored at 22°C for 5 days with agitation. Changes in the expression levels of mir-223, mir-92a and mir-222 were determined using qRT-PCR method on days zero, three and five of storage. The results were analyzed using paired-sample-T test using GenEX version 7 software.

Results

It was found that the expression of miR-223 gradually increased during the third and fifth days compared to the day 0 of platelet concentrate storage ($p < 0.05$). The expression of mir-92a also significantly increased on the third and the fifth days compared to day 0 of storage ($p < 0.05$). However, the expression of mir-222 gradually decreased over the fifth day of storage ($p < 0.05$).

Conclusions

This study showed that the determination of miRNAs in the platelet-derived microparticles with common markers such as platelet count, MPV determination, platelet volume determination, leukocyte count, swirling assay, and pH measurement can be useful tools for identifying cellular damage associated with platelet storage lesion and maybe potential indicators for evaluating the quality and viability of platelets stored *in vitro* conditions.

Key words: MicroRNA, Platelets, Plasma

Received: 4 Feb 2020

Accepted: 25 Apr 2020

Correspondence: Mousavi Hosseini K., PhD in Medicinal Chemistry. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052160; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: mkmousavi@yahoo.com