

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

قاسم عباس زاده^۱، کامران عطاردی^۱، 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 پلاسما 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 < ۰/۰۰۱). بیان mir-92a نیز در روز سوم و پنجم نسبت به روز صفر نیز افزایش معناداری را نشان داد (p < ۰/۰۰۵). از طرفی بیان mir-222 به تدریج در طول مدت زمان ذخیره سازی طی پنج روز کاهش یافت (p < ۰/۰۰۵).

نتیجه گیری

مطالعه نشان داد که تعیین پروفایل miRNA های میکروپارتیکل 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 آزیتاسیون 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 سهم 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 lesion (PSL) یا platelet storage defect (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 2 ± 22 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 دیتالاگر 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

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

تعیین سایز و هویت میکروپارتیکل‌ها:

برای تعیین سایز 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 کونژوگه با FITC و 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 ۰/۹ میکرومول، ۰/۵ میکرومول و ۰/۳ 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 μL ۵۰۰ 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 μL ۱۰۰ 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 mg ۱۲۰۰۰ 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

پلاکتی در دمای 2 ± 22 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 کالیبره XS 800i (سیس‌مکس - ژاپن) روی نمونه انجام شد و واحدهایی با شمارش پلاکتی حداقل $10^5 \times 5/5$ و شمارش لکوسیتی کمتر از $10^2 \times 0.2$ و $\text{pH} \geq 6.2$ انتخاب شدند (۲۴). لوله‌های فالكون حاوی کنسانتره پلاکتی به مدت ۱۰ دقیقه در دور $\text{mg} \times 200$ به منظور رسوب سلول‌ها سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی به لوله فالكون دیگری منتقل شده و مجدد در دور $\text{mg} \times 2100$ 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 $\text{mg} \times 20000$ 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 $\text{mg} \times 20000$

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).

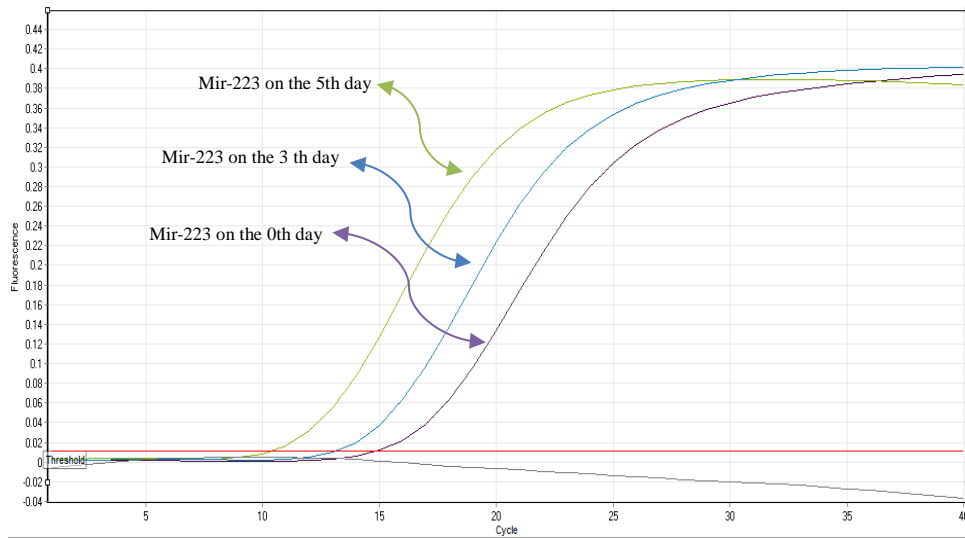
جدول ۲: مواد و مقادیر استفاده شده در qRT-PCR

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

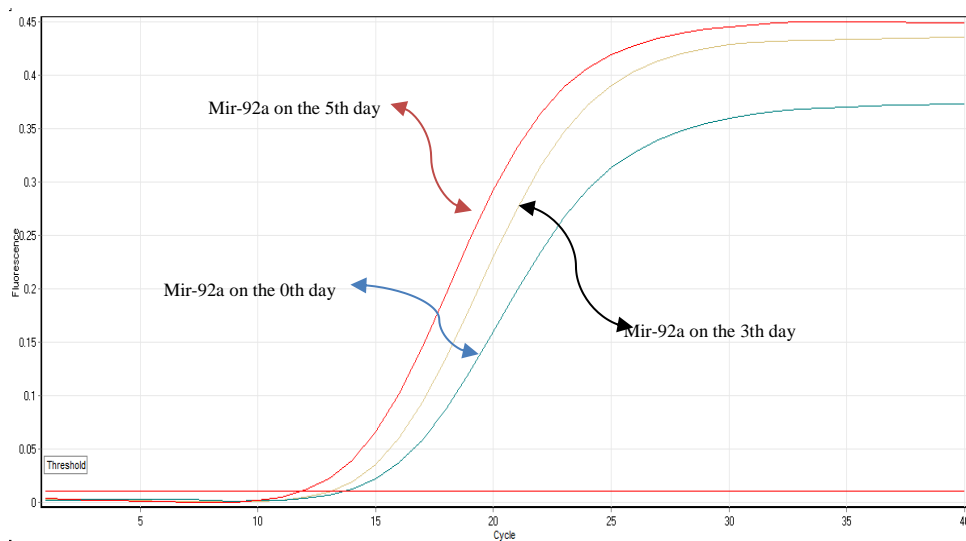
آبی بی رنگ در بالای لوله. فاز رویی آبی بی رنگ حاوی RNA می باشد که با دقت با استفاده از سمپلر و در زاویه ۴۵ درجه به میکروتیوب RNase free منتقل گردید. از آن جایی که مقدار RNA پلاکت بسیار ناچیز است، لذا برای رسوب بهینه به مایع حاصل از مرحله قبل، ۵ گلیکوژن اضافه گردید و نمونه به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۰- درجه 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

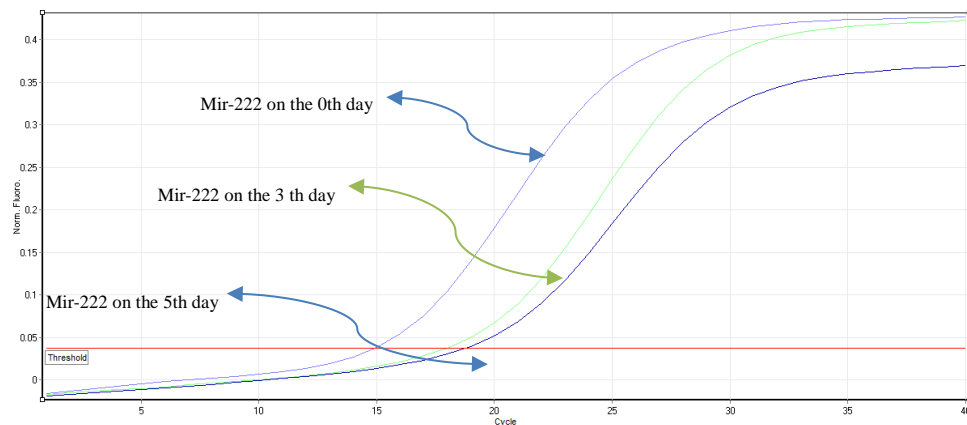
پس از استخراج RNA و اندازه گیری غلظت آن با دستگاه نانودراپ، cDNA مربوط به هر miRNA با استفاده از کیت (بن یاخته، ایران) ساخته شد. ساخت cDNA شامل دو مرحله بود. در مرحله اول واکنش poly A polymerase طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت و در مرحله دوم ساخت cDNA پس از افزودن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



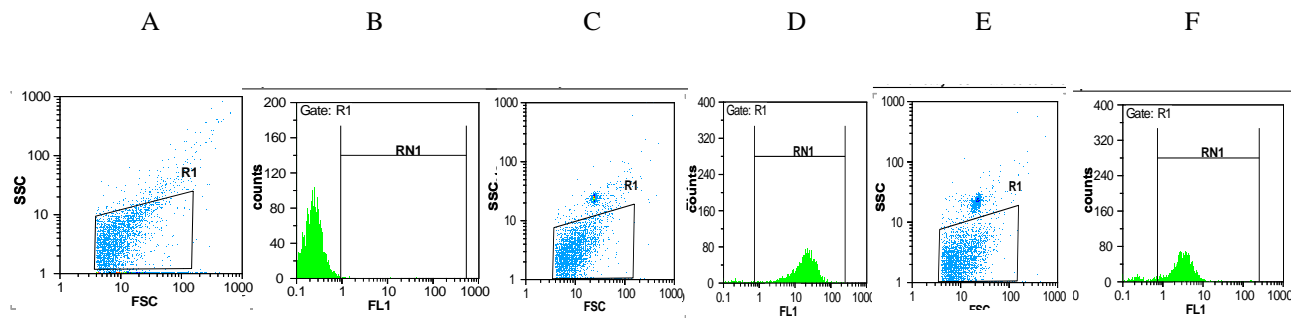
شکل ۳: منحنی Real Time PCR برای mir-222 طی روزهای صفر، سوم و پنجم ذخیره‌سازی

به علاوه نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی میکروپارتیکل‌های 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 یافته‌های DLS برای ارزیابی اندازه میکروپارتیکل‌های استخراج شده طی دوران ذخیره‌سازی نیز نشان داد که میانگین توزیع اندازه بیش از ۹۵٪ ذرات استخراج شده بین ۱-۱/۰۱ μm می‌باشند. به علاوه شدت تفرق نور که متناسب با ابعاد ذرات می‌باشد، طی دوران ذخیره‌سازی افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از ارزیابی با روش‌های فلوسیتومتری و DLS بیانگر مطلوب بودن روش استفاده شده برای استخراج میکروپارتیکل‌ها بود (شکل‌های ۴ و ۵).

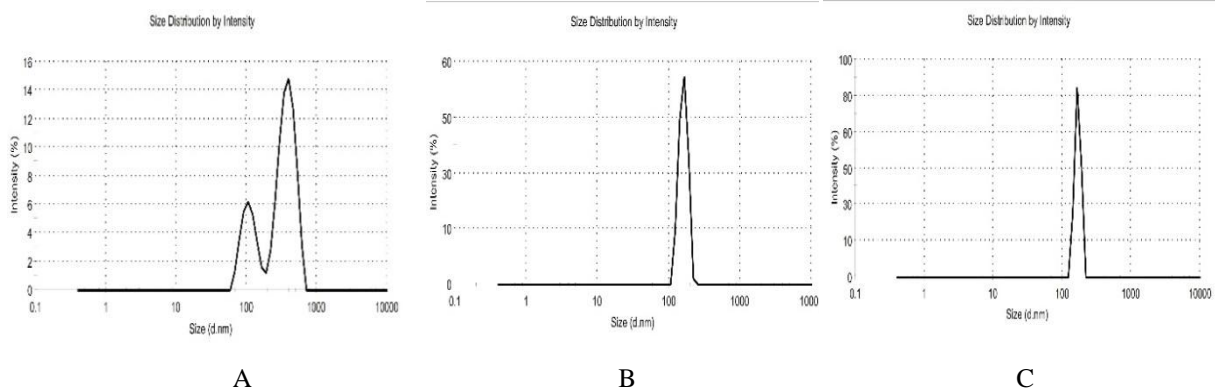
پس از انجام واکنش‌های qRT-PCR، تغییرات بیان miRNA های مورد مطالعه با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به کمک نرم‌افزار GenEX نسخه ۷ مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت (۲۸).

یافته‌ها

نتایج فلوسیتومتری و DLS برای ارزیابی میکروپارتیکل‌ها: نتایج حاصل از ارزیابی میکروپارتیکل‌های جدا شده از کنسانتره‌های پلاکتی در طی روزهای صفر، سه و پنج ذخیره‌سازی با روش فلوسیتومتری، نشان داد که قریب به ۹۰٪ از وقایع شمارش شده برای رنگ‌آمیزی شاخص سطحی CD40 با استفاده از anti-CD40-FITC مثبت بودند.



شکل ۴: نمونه‌ای از نتایج فلوسیتومتری به روز شاخص‌های سنجی CD61 و CD41 بر سطح میکروپارتیکل‌های پلاکتی: به ترتیب A و B مربوط به ایزوتیپ کنترل IgG، C و D نمودار Gating و هیستوگرام شاخص سطحی CD-41 رنگ‌آمیزی شده با anti-CD41-FITC. E و F نمودار Gating و هیستوگرام شاخص سطحی CD-61 رنگ‌آمیزی شده با anti-CD61-FITC



شکل ۵: نمونه‌ای از نمودارهای توزیع اندازه ذرات برحسب شدت نور متفرق شده با استفاده از روش DLS (به ترتیب A) میانگین توزیع اندازه میکروپارتیکل‌ها در روز صفر ذخیره‌سازی. (B) میانگین توزیع اندازه میکروپارتیکل‌ها در روز سه ذخیره‌سازی. (C) میانگین توزیع اندازه میکروپارتیکل‌ها در روز پنج ذخیره‌سازی.

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

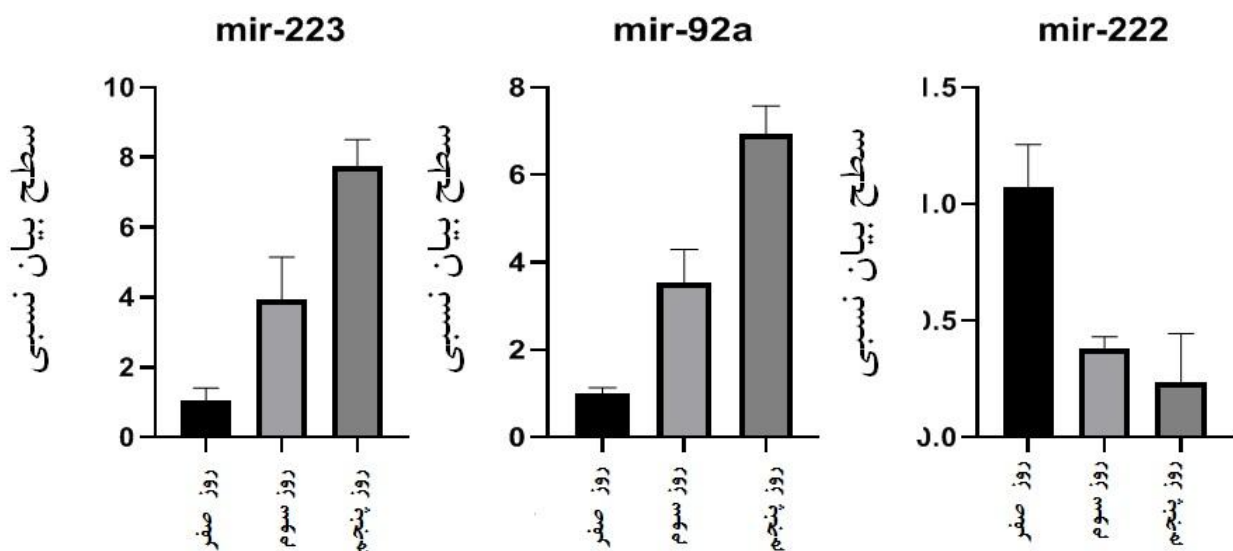
در این مطالعه با ارزیابی تغییرات در بیان miRNA-223 در میکروپارتیکل های ۵ واحد کنسانتره پلاکتی طی روزهای صفر، سه و پنج، مشخص شد که در روز سوم ذخیره سازی نسبت به روز صفر، بیان میکرو RNA مورد نظر به طور چشمگیری افزایش یافت ($p < 0.001$). این افزایش در روز پنجم نسبت به روز صفر نیز مشاهده شد. به گونه ای که 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 ذخیره سازی 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 ذخیره سازی در شرایط *in-vivo* طی روزهای صفر، سه و پنج رخ می دهد. 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 ذخیره سازی 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	۳/۷۸ (۱/۲-۲/۶۳۰۷)	< 0.001	۴/۶۹ (۱/۲۳-۳/۲۳)	< 0.001	۱/۸۴ (۰/۶۹-۱/۳۲)
mir-92a	۰/۰۴۳	۱/۵۸ (۰/۰۴۲-۱/۰۵)	۰/۰۱۸	۲/۵۱ (۰/۱۳-۱/۰۷)	۰/۰۴۳	۱/۸۳ (۰/۳۵-۰/۴۵)
mir-222	۰/۰۳۱	۱/۸۶ (۱/۹۶-۵/۴۶)	۰/۰۴۱	-۲/۳۷ (۰/۸۰-۳/۲۹)	۰/۰۴۳	-۰/۵۲ (۴/۰۹-۳/۰۸۶)



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

فعال‌سازی و آپوپتوز نقش دارند و در پاسخ به تغییرات و محرک‌های محیطی، بیان شان تغییر می‌کند تا پاسخ مناسب پلاکتی را تنظیم نمایند (۳۶-۳۴، ۱۰). بنابراین miRNA ها، نقشی حیاتی در بیولوژی پلاکت‌ها طی شرایط ذخیره‌سازی ایفا می‌کنند (۲۴). مهم‌تر این که پلاکت‌ها قادرند متعاقب فعال‌سازی، حداقل بخشی از miRNA های خود را در میکروپارتیکل‌های پلاکتی (PMP) منتشر کنند و بدین ترتیب عملکرد سلول‌های دریافت‌کننده 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 می‌کنند و بدین ترتیب بیان سلولی ژن‌ها و عوامل اپی‌ژنتیک در سلول‌های گردش خون، به ویژه سلول‌های اندوتلیال را تعدیل و تنظیم می‌نمایند (۲۰). تحقیقات در مورد این که چگونه miRNA ، بیان mRNA پلاکتی را تنظیم می‌کنند و چه تاثیری بر روی سایر سلول‌های هدف متعاقب تزریق فرآورده‌های پلاکتی اعمال می‌نمایند، برای درک بیشتر ما از مکانیسم‌های مولکولار ضایعات نگهداری پلاکت‌ها و ارزیابی بیولوژی پلاکت‌ها در طی ذخیره‌سازی و کاهش عوارض نامطلوب متعاقب ترانسفیوژن و مدیریت ذخایر فرآورده‌های پلاکتی در بانک‌های خون ارزشمند است (۲۴، ۴). از طرفی دیگر، درک این مکانیسم‌های مولکولار می‌تواند در بهبود کیفیت و افزایش طول عمر نگهداری پلاکت‌ها نقش به سزایی داشته باشد (۲۴، ۹). با وجود مطالعه‌های گسترده در مورد میکروپارتیکل‌های پلاکتی و نقش آن‌ها در ضایعات ذخیره‌سازی پلاکت، اما گزارش‌ها و مطالعه‌ها در مورد محتوی میکروRNA ای آن‌ها محدود می‌باشند. امروزه تعامل بین میکروپارتیکل‌های پلاکتی و miRNA های پلاکتی کاملاً مشخص شده است به طوری که mir-223 و mir-126 فراوان‌ترین mir های موجود در میکروپارتیکل‌های پلاکتی محسوب می‌شوند (۳۸).

در مطالعه حاضر بیان mir-222 ، mir-92a و mir-223 در روزهای صفر، سه و پنج ذخیره‌سازی در میکروپارتیکل‌های استخراج شده از کنسانتره‌های پلاکتی تهیه شده به روش پلاسما غنی از پلاکت با استفاده از

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از qRT-PCR برای سنجش تغییرات در پروفایل mir-222 ، روند کاهشی در بیان میکرو RNA مذکور را نشان داد. به گونه‌ای که بیان mir-222 به تدریج در طول مدت زمان ذخیره‌سازی طی پنج روز کاهش می‌یابد ($p < 0.05$). در روز پنجم ذخیره‌سازی، کاهش بیان این میکرو RNA به حدود ۲ برابر در مقایسه با سطح بیان آن در روز صفر می‌رسد. میزان بیان این میکروRNA 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 کنسانتره‌های 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 میکروRNA های انتخابی طی دوران ذخیره‌سازی، دستخوش نوسانات معناداری می‌شود. پلاکت‌ها میزان ترانسکریپتوم متنوعی (تقریباً $10^{10} \times 2$ گرم در هر پلاکت) می‌باشند که از تقریباً ۹۵۰۰ RNA پیامبر (mRNA) و کلاس‌های متفاوتی از RNA های کوچک غیر کدکننده تشکیل می‌شوند. پلاکت‌ها این متریال‌های ژنتیکی را نیز از سلول اجدادی‌شان، مگاکاریوسیت، نگه می‌دارند. تقریباً ۸۰٪ از این RNA های کوچک غیر کدکننده، از نوع میکروRNA هستند. میکروRNA ها، RNA های کوچک غیر کدکننده به طول ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید می‌باشند 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 میکروRNA های پلاکتی، فراتر از نقش بیولوژیک شان در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک، به عنوان بیومارکرهایی برای تشخیص، پیگیری و کنترل بیماری‌های مختلف به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (۳۳-۳۰، ۲۴). بر مبنای گزارشی از تحقیقات پیشین، میکروRNA های محدودی به عنوان بیومارکرهای کیفی برای ارزیابی ضایعات ناشی از ذخیره‌سازی پلاکت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اغلب این میکروRNA 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 اگرگیشن 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). بی‌پان 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 (۱۸، ۱۷).

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 اگرگیشن 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). بی‌پان 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 (۱۸، ۱۷).

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

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 لویرو 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 وزیکول‌های 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 بیورژن 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, Nollet 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- Elgheznavy 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 JI, 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, Elgheznavy 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

¹*Blood 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