

تغییرات میتوکندریال DNA، طی نگهداری فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش پلاسمای غنی از پلاکت

لیلا وکیلی^۱، آرزیتا چگینی^۲، شهرام سمیعی^۳، مژگان شایگان^۴

چکیده

سابقه و هدف

فعال شدن پلاکت، به دلایل متعدد از لحظه نمونه‌گیری تا قبل از تزریق فرآورده رخ می‌دهد. پلاکت‌های فعال شده، میتوکندری‌های فعال را به سمت غشا تغییر مکان داده، آن‌ها از غشاء جوانه زده و می‌توانند به صورت آزاد ریزش کرده و منجر به آزاد شدن واسطه‌های پیش التهابی و میتوکندریال DNA گردند. بدین جهت، میزان میتوکندریال DNA را به عنوان یکی از پارامترهای فعالیت پلاکتی در نظر گرفته‌اند. هدف از این مطالعه، مقایسه میزان میتوکندریال DNA در طول زمان نگهداری بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۲۲ فرآورده پلاکتی PRP، پس از اخذ رضایت‌نامه از اهداکنندگان مرد مراجعه‌کننده به مرکز نوآوری سازمان انتقال خون ایران به دست آمد. از این کیسه‌ها در روزهای ۱، ۳ و ۵ نمونه‌گیری شد تا میزان تغییرات میتوکندریال DNA در این فرآورده‌ها توسط روش Real time PCR بررسی شود. نتایج با آزمون آماری paired t-test تجزیه و تحلیل شده و میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان میتوکندریال DNA در روز اول افزایش و به تدریج روز ۳ به ۱، ۰/۸ برابر و در روز ۵ به ۳، ۰/۶ برابر و در روز ۵ به ۱، ۰/۴۹ برابر تغییر یافته و کاهش را نشان داد. این تغییرات در روزهای ۳ به ۱ به صورت غیر معنادار و در روزهای ۵ به ۱ به صورت معنادار بود ($P=0/003$).

نتیجه‌گیری

میزان میتوکندریال DNA در فرآورده‌های تولید شده به روش PRP، در روز اول افزایش و طی روزهای ذخیره‌سازی تغییر کرده و کاهش یافت.

کلمات کلیدی: Real-Time Polymerase Chain Reaction، DNA، میتوکندری، پلاسمای غنی از پلاکت

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۱

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسئول: متخصص بیهوشی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
- ۳- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- دکترای ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

پلاکت یکی از پر مصرف‌ترین فرآورده‌های انتقال خون است که علاوه بر موارد درمانی مانند استفاده برای افراد دچار ترومبوسیتوپنی، در برخی موارد نیز جهت پیشگیری از خونریزی، در درمان بیماران مبتلا به ترومبوسیتوپنی بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، تحت شیمی‌درمانی و غیره کاربرد دارد (۲، ۱). برای حصول نتیجه مطلوب در تزریق پلاکت، کیفیت این محصول از اهمیت به‌سزایی برخوردار است چرا که در این گونه افراد تزریق مکرر، می‌تواند مشکلات عدیده‌ای مانند ایمونیزاسیون و مقاومت پلاکتی برای بیمار ایجاد کند و سبب بروز عوارض انتقال خون مانند آسیب حاد ریوی ناشی از انتقال خون (TRALI)، واکنش‌های غیر همولیتیک ناشی از انتقال خون (NHTRs) و سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS) نیز شود (۶-۳، ۱).

پلاکت‌های پستانداران فاقد هسته بوده و با توجه به عدم وجود هسته، سلامت پلاکت‌ها تا حد زیادی توسط سلامت میتوکندری آن‌ها تعیین می‌شود (۷). پلاکت‌ها منبع مهمی برای میتوکندری هستند و میتوکندری‌ها نیز می‌توانند به علت ترشح عواملی موجب تحریک پاسخ‌های التهابی شوند. در نتیجه میتوکندری‌ها می‌توانند در ارتباط با کیفیت محصولات خونی مطرح باشند. از عواملی که توسط میتوکندری‌ها ترشح می‌شوند، می‌توان به الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب DAMPs (Damage associated molecular patterns) اشاره نمود که می‌توانند در سلول‌ها تحت شرایط استرس، القا و تولید شوند. این مولکول‌ها علاوه بر نقش‌های فیزیولوژیک در داخل سلول، زمانی که در محیط خارج سلولی قرار گیرند نقش‌های متفاوتی از جمله آماده نگه‌داشتن بدن در مقابل خطر، تحریک پاسخ‌های التهابی و تحریک فرآیند بازسازی بافت آسیب‌دیده کسب می‌کنند. در ضمن بعضی از سلول‌هایی که در معرض استرس تهدید کننده حیات قرار می‌گیرند نیز قادر به ترشح DAMPs می‌باشند (۸). DAMPs به‌طور کامل شامل نوع میتوکندریایی و DNA سلولی و سیتوزولیک و پروتئین‌های هسته‌ای هستند که خارج از سلول آزاد شده‌اند و به عنوان واسطه‌های ایمنی مرتبط با التهاب و آسیب مطرح می‌باشند.

گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها از منابع مهم DAMPs میتوکندریایی هستند (۱). یکی از مهم‌ترین انواع DAMPs که تاکنون مطرح شده است، میتوکندریال DNA (mtDNA)؛ (mitochondrial) است. به دلیل این که پلاکت‌ها به میزان زیادی میتوکندری دارند، mtDNA های مشتق از پلاکت می‌توانند به عنوان فاکتورهای خطر ساز برای آغاز واکنش‌های غیر همولیتیک ناشی از انتقال خون از جمله ARDS و TRALI محسوب شوند که از عوارض تهدید کننده حیات می‌باشند (۸، ۵، ۴). بدین ترتیب mtDNA که بالاترین سطح آن در کنسانتره‌های پلاکتی یا PCs گزارش شده است، موجب واکنش‌های ناشی از انتقال خون می‌شود (۹، ۴). به علاوه mtDNA که به عنوان فعال‌کننده نوتروفیل‌های پلی‌مورفونوکلئار شناخته شده است، به سلول‌های اندوتلیال قابلیت نفوذ و تراوایی را القا کرده و منجر به پاسخ‌های التهابی در داخل بدن زنده (*in vivo*) نیز می‌شود. میزان mtDNA در PCs به‌طور قابل توجهی با میزان عوارض جانبی تزریق خون در ارتباط است (۱۰). علاوه بر افزایش میزان mtDNA در فرآورده‌های پلاکتی، فعالیت بیولوژیک آن نیز برای ایجاد واکنش‌های بعد از انتقال خون مهم است. مجاورسازی پلاسمای جدا شده از فرآورده‌های پلاکتی با نوتروفیل‌ها و پلاکت‌ها، یکی از راه‌های ارزیابی فعالیت بیولوژیک آن می‌باشد. غلظت‌های پائین تر mtDNA، هنگامی که با formyl-l-methionyl-l-leucyl-l-phenylalanine (fmlp) و هم چنین با آنتی‌بادی‌های HLA همراه می‌شوند، قادر به فعال‌سازی سلول‌های ایمنی ذاتی (نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و بازوفیل‌ها) هستند. این نتایج بیان می‌کند که آن‌ها در فرآورده‌های خونی دارای عملکردی به عنوان BRMs (Biological response modifiers) پاسخ اصلاح شده بیولوژیک هستند در صورتی که در آن فرآورده، سایر محرک‌ها از قبیل آنتی‌بادی‌های HLA حضور داشته باشند. اما در غیاب فاکتورهای (هم افزایی) سینرژیک، جهت فعال‌سازی گلبول‌های سفید WBC، به غلظت‌های بالایی از آن‌ها برای وقوع NHTR پس از تزریق پلاکت نیاز داریم در نتیجه آن‌ها به تنهایی نمی‌توانند موجب القای فعال‌شدن در گلبول‌های سفید شوند اما در همراهی با فاکتورهای سینرژیک این امکان به

۷۰-۶۰ میلی لیتر در هر کیسه تهیه شد (کیسه‌های شرکت ماکوفارمای کشورفرانسه).

فرآورده‌های تهیه شده را تا ۵ روز پس از تولید، در آژیتاتور پلاکتی ذخیره کردیم. قبل از شروع نمونه‌گیری و انجام هر آزمایش، شماره و برجستگی خاص بر روی کیسه‌های پلاکت کنسانتره تهیه و چسبانیده شدند. هم چنین تاریخ تحویل و تهیه فرآورده در چک لیست‌های مخصوص ثبت گردید. در واقع به هر کیسه، کد شناسه مخصوص این مطالعه اختصاص داده شد. نمونه‌گیری از تمامی کیسه‌ها به صورت یکسان و در سیستم بسته صورت گرفت.

برای به دست آوردن سوپرناتانت پلاکتی، ابتدا فرآورده‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۲۰ الی ۲۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۳۰۰۰ G به مدت ۵ دقیقه و در مرحله بعد محلول رویی حاصل از آن با دور ۱۰۰۰۰ G به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و از سوپرناتانت حاصل از آن جهت استخراج mtDNA پلاکتی استفاده نمودیم. استخراج mtDNA پلاکتی با استفاده از QIAamp DNA Mini Kit (کارخانه کیناژن ساخت کشور آلمان) صورت گرفت. تغییرات mtDNA موجود در محلول رویی یا سوپرناتانت این فرآورده‌ها در روزهای ۱، ۳ و ۵ ذخیره‌سازی توسط روش Real time PCR با روش سایبرگرین اندازه‌گیری شد. به عنوان ژن هدف، از آغازگر ژن *COX3* و جهت کنترل داخلی از *GAPDH* استفاده شد.

هم چنین جهت کنترل مثبت از نمونه رسوب پلاکتی تیمار شده با پراکسید هیدروژن و کنترل منفی از آب مقطر استفاده نمودیم. آزمایش‌ها با استفاده از دستگاه روتوژن انجام شد و پس از نرمالیزاسیون و محاسبه میزان تغییرات یا fold change در روزهای ذخیره‌سازی نسبت به یکدیگر با استفاده از نرم‌افزار REST ۲۰۰۹، با استفاده از نتایج حاصل از آن، نمودار مربوطه به کمک نرم‌افزار prism ۸ ترسیم گردید.

پس از انجام آزمایش‌ها به صورت دوپلیکیت از Ct هر یک از نمونه‌ها میانگین گرفته و داده‌های حاصل را در نرم‌افزار REST ۲۰۰۹ وارد و میزان fold change را در روزهای مختلف ۱ و ۳ و ۵ محاسبه کردیم تا میزان fold

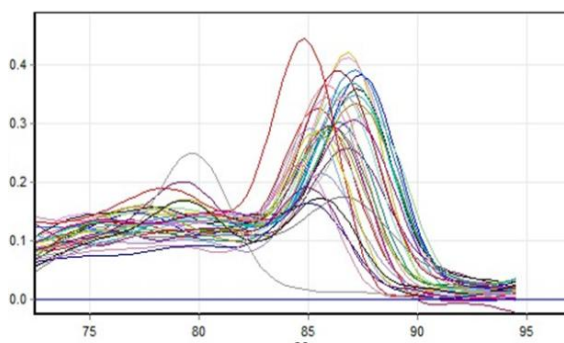
وجود می‌آید. پارتیکل‌های حاوی mtDNA در پلاسما در اندازه‌های مختلف وجود دارد با این حال هنوز ماهیت این ذرات مشخص نیست و منشأ آن می‌تواند از میتوکندری‌های با قطر ۵/۵ تا ۱ میکرومتر و طول ۵ تا ۱۵ میکرومتر و یا پلاکت‌ها (هر پلاکت شامل متوسط ۴ کپی از ژنوم میتوکندریال است) و یا از قطعات سلولی باشد (۱۱). البته در دنیا مطالعه‌های انگشت شماری، به خود مولکول mtDNA به عنوان یک DAMPs در فرآورده‌های خونی پرداخته‌اند، بدین جهت ما هم بر آن شدیم به جهت یافتن روش‌های نوین در بهبود کیفی هر چه بیشتر محصولات پلاکتی و تزریق محصولات با کیفیت‌تر و با حداقل عوارض، برای اولین بار در ایران مطالعه‌ای بر روی mtDNA محصولات پلاکتی انجام دهیم. هدف تحقیق حاضر، بررسی mtDNA بر روی محصول پلاکتی PRP و مقایسه میزان mtDNA در طول زمان نگهداری (روزهای ۱، ۳ و ۵) بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۲۲ نمونه پلاکت PRP تهیه شده از اهداکنندگان مرد داوطلب، در مرکز نوآوری سازمان انتقال خون ایران پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه جهت شرکت در مطالعه گرفته شد (کد اخلاق: IR.TMI.REC.1397.011). حجم نمونه با توجه به مقالات باکور و همکاران انتخاب شد (۱۲). طبق مطالعه آن‌ها، تعداد نمونه‌ها در هر روش ۱۵-۶ عدد بود. ماده ضد انعقاد/نگهدارنده تمامی کیسه‌ها CPDA بود. هیچ انتخابی در مورد شرکت سازنده کیسه خون، گروه خون و یا مشخصات اهداکننده وجود نداشت. کیسه‌های پلاکتی پس از دریافت، به مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران منتقل و به آژیتاتور پلاکتی انتقال داده شد و در دمای $22 \pm$ ۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. درجه حرارت و زمان نگهداری در آژیتاتور پلاکتی روزانه چک شد و مطالعه بر روی کیسه‌های دارای رنگ و swirling مناسب صورت گرفت.

مطابق با استانداردهای سازمان انتقال خون، پلاکت کنسانتره از طریق سانتریفیوژ کردن خون کامل و با حجم

آغازگر مشابه دمای ذوب نمونه NTC است. بدین جهت از آغازگر دیگری یعنی آغازگر ژن *COX3* جهت ادامه این مطالعه استفاده نمودیم. جهت تعیین میزان کارایی آغازگرها نیز از رقت‌های مختلف H_2O_2 استفاده شد و طبق یافته‌های حاصل کارایی آغازگرها جهت ادامه مطالعه صد در صد در نظر گرفته شد. در هر ران کاری مربوط به نمونه‌های PRP، علاوه بر ژن *COX3*، ژن *GAPDH* و NTC به تفکیک استفاده شد که نمودارهای (Cycle Threshold) Ct مربوط به هر یک و نتایج مربوط به نمودارهای دمای ذوب مربوط به نمونه‌های PRP نمایش داده شده است (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۱: نمودارهای Cycle Threshold مربوط به ژن *COX3*، ژن *GAPDH* و NTC

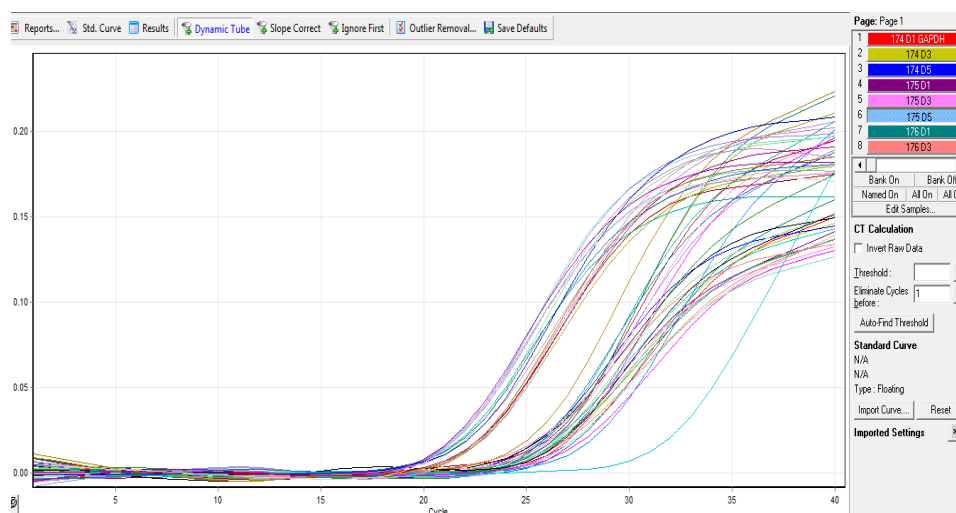
change در روزهای مختلف ذخیره فرآورده به دست آمده و مقایسه شود. میزان P کمتر از ۰ معنادار در نظر گرفته شد.

سپس اطلاعات موجود در چک لیست و نتایج آزمایش با روش t-test توسط نرم‌افزار REST ۲۰۰۹ آنالیز شده، نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism رسم گردید.

یافته‌ها

با توجه به آن که این مطالعه برای اولین بار در ایران صورت گرفت، در مرحله اول راه‌اندازی آزمایش، از آغازگر ND6 به عنوان آغازگر اصلی و هم‌چنین از آغازگر *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی در هر دوره کاری استفاده شد. به عنوان کنترل مثبت از نمونه‌های رسوب پلاکتی، پس از سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ g اسفاده شد. با پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با رقت ۱/۳ که در بن ماری در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲ ساعت جهت آزادسازی هر چه بیشتر mtDNA تیمار شده بود، استفاده شد. از آب مقطر اتوکلاو شده نیز به عنوان NTC استفاده گردید.

پیک نمودار ذوب، هم برای نمونه‌ها و هم برای کنترل مثبت و منفی توسط آغازگر ND6 چه قبل و چه بعد از تیمار کردن با H_2O_2 روی هم منطبق و از هم قابل افتراق نبود. این بدان علت است که دمای ذوب بهینه برای این



نمودار ۲: نمودار دمای ذوب نمونه‌های PRP

جدول ۱: نتیجه تغییرات mtDNA روز ۳ به ۱ در نمونه‌های PRP

ژن	نوع	کارایی	بیان	انحراف معیار	CI %۹۵	pH
gene ۱	REF	۱/۰	۱/۰۰۰			
gene ۲	TRG	۱/۰	۰/۸۲۸	۰/۳۴۹-۲/۰۰۴	۰/۰۹۸-۶/۱۸۱	۰/۴۰۳

جدول ۲: نتیجه تغییرات mtDNA روز ۱ به ۵ در نمونه‌های PRP

ژن	نوع	کارایی	بیان	انحراف معیار	CI %۹۵	pH
gene ۱	REF	۱/۰	۱/۰۰۰			
gene ۲	TRG	۱/۰	۰/۴۹۹	۰/۱۹۸-۱/۳۴۳	۰/۰۷۰-۳/۸۲۲	۰/۰۰۳

۱ به صورت غیر معنادار و در روز ۵ به ۱، ۵ به ۳ به صورت معنادار بود. تمام نمونه‌های این مطالعه از اهداکنندگان سالم به دست آمد. در مطالعه دیگری میزان mtDNA را در افراد با نقص ایمنی و یا دارای التهاب یا عفونت بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که میزان آن نسبت به افراد طبیعی، متفاوت می‌باشد (۱۴، ۱۳).

در مطالعه سیمون و همکارانش، mtDNA در فرآورده‌های FFP زنان در مقایسه با سایر فرآورده‌های تهیه شده از زنان و مردان، به میزان بالاتری موجود بود. آن‌ها بیان کردند که بین جنسیت و افزایش پاسخ‌های التهابی ارتباط وجود دارد. mtDNA می‌تواند با افزایش پاسخ‌های التهابی مرتبط باشد (۵). به همین جهت مطالعه ما تنها روی نمونه‌های مردان صورت گرفت تا اثر جنسیت در این مطالعه از بین رود و تنها بر روی یک نوع فرآورده پلاکت تهیه شده از مردان مقایسه صورت گیرد. آن‌ها در این مطالعه، مایع‌رویی نمونه‌های پلاکتی از نوع PRP را پس از دو مرحله سانتریفیوژ سبک و سنگین در دوره‌های ۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه و دور ۱۰۰۰۰g به مدت نیم ساعت جداسازی کردند. می‌توان انتظار داشت در این نوع جداسازی هر دو نوع mtDNA آزاد و پارتیکلی در مایع‌رویی پلاسما وجود داشته است و اندازه‌گیری هر دو نوع صورت گرفته است در حالی که در مطالعه ما از روش فیلتراسیون و اولتراسانتریفیوژ استفاده نشد.

در مطالعه‌هایی که به دنبال یافتن mtDNA هستیم، برای پیشگیری از بروز خطا، باید از اختصاصیت این امر که

پس از انجام آزمایش‌ها به صورت دو پلیکیت، از Ct هر یک از نمونه‌ها میانگین گرفته و داده‌های حاصل را در نرم‌افزار ۲۰۰۹ REST وارد و میزان تغییرات (fold change) را در روزهای مختلف محاسبه نمودیم که مطابق نتایج حاصل، میزان تغییرات در mtDNA مایع‌رویی فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP در روز اول افزایش داشت و به تدریج روز ۳ به ۱، ۰/۸ برابر، در روز ۳ به ۵، ۰/۶ برابر و در روز ۵ به ۱، ۰/۴۹ برابر تغییر یافته و کاهش را شاهد بودیم که این تغییرات در روزهای ۳ به ۱ به صورت غیر معنادار و در روزهای ۵ به ۱ به صورت معنادار می‌باشد (p= ۰/۰۰۳). در تمام نمونه‌های PRP، mtDNA به میزان متفاوت حضور داشت و میزان آن در روزهای مختلف با یکدیگر متفاوت بود (جدول ۱ و ۲).

بحث

پلاکت‌ها می‌توانند به عنوان واسطه‌های التهابی مداخله‌کننده در تزریق خون باشند و محصولات پلاکتی که در ارتباط با عوارض ناخواسته انتقال خون هستند، حاوی میزان بیشتری mtDNA نسبت به محصولات فاقد عارضه‌اند (۹). طبق یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر، تغییرات mtDNA در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP در طی روزهای ۱، ۳ و ۵ در فرآورده پلاکت کنسانتره (PC) بدین صورت بود که در روز ۱ و ۳، هم‌چنین در روزهای ۳ و ۵، ۱ و ۵ کاهش میزان آن در زمان نگهداری مشاهده شد که این تغییر در روزهای ۳ به

در این واحدها باشد. علاوه بر روش‌های تولید، محصول‌های افزایشنده، ست‌های جمع‌آوری و فیلترهای کم لکوسیت مورد استفاده نیز می‌تواند روی میزان mtDNA مؤثر باشند بنابراین، پارامتر mtDNA می‌تواند به عنوان یک مارکر بیان‌کننده کیفیت محصول نیز در نظر گرفته شود. هم‌چنین در این مطالعه روند نوسانی از افزایش و کاهش mtDNA در هر یک از انواع محصولات گلبول قرمز در روزهای ۱ تا ۴۲ ذخیره‌سازی وجود داشت که این روند نامنظم و متفاوت از افزایش و کاهش در میزان mtDNA، طی روزهای مختلف ذخیره‌سازی، در هر یک از محصولات، هم به طور مجزا طی روزهای ذخیره و هم در مقایسه با بقیه محصولات از همان نوع دیده شد (۱۲).

در مطالعه حاضر، تغییرات mtDNA در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP را در طی روزهای ۱، ۳ و ۵ در مایع رویی فرآورده‌های پلاکت، بررسی کردیم و تغییرات را در روزهای ذخیره‌سازی و نگهداری فرآورده مشاهده نمودیم به طوری که در روز اول افزایش و در روزهای ۱ به ۳ هم‌چنین در روزهای ۵ به ۳ و ۵ به ۱ کاهش میزان mtDNA دیده شد که این تغییر در روزهای ۱ به ۳ به صورت غیر معنادار و در روز ۵ به ۱ و ۵ به ۳ به صورت معنادار بود.

در حالی که بودرو و همکارانش بیان نمودند که میزان mtDNA در فرآورده پلاکتی بالاست اما تغییرات آن را هنگام نگهداری بررسی نکردند (۹). در چند مطالعه نشان داده شده، ذخیره‌سازی طولانی مدت کنسانتره پلاکتی (طولانی‌تر از ۴ روز)، سبب خطر بیشتر بروز عوارض جانبی در بیماران می‌شود (۱۷-۱۹).

در مطالعه دیگری که توسط کوگناس و همکارانش صورت گرفت، از فرآورده‌های پلاکتی آفرزین استفاده کردند و مشاهده نمودند که سطح mtDNA در فرآورده تزریقی به بیماران دچار عارضه $(52/64 \pm 122/55 \text{ ng/L})$ در روز ۴ در مقایسه با روز ۱ تا ۳ افزایش و سپس کاهش یافته و به میزان روز اول می‌رسد $(8 \pm 8/93 \text{ ng/L})$. البته آن‌ها در گروه پلاکت‌هایی که ایجاد عارضه شده بود، افزایش mtDNA را در روز سوم مشاهده نموده بودند. آن‌ها در این مطالعه گزارش نمودند که mtDNA در روزهای اول

حتماً mtDNA اندازه‌گیری شده، اطمینان حاصل شود. در مطالعه ما جهت کنترل اختصاصیت از پراکسید هیدروژن برای آزادسازی mtDNA از رسوب پلاکت‌ها و ایجاد نمونه‌ای به عنوان کنترل مثبت استفاده کردیم. لازم به ذکر است که پس از هر بار سانتریفیوژ تعداد سلول‌های موجود در مایع رویی پلاسما در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد که این میزان برابر صفر بود البته با توجه به دور بالای سانتریفیوژ، عملاً هیچ سلول هسته‌داری در نمونه باقی نخواهد ماند.

علاوه بر این در مطالعه‌های بیوانفورماتیک نسبت به اختصاصیت آغازگر انتخاب شده توجه کافی صورت گرفته است. لی و همکاران دریافتند mtDNA در فرآورده‌های تزریقی همانند پلاکت‌ها وجود دارد و بدین جهت ممکن است این محصولات خونی نقش مهمی را در آغاز TRALI داشته باشند. آن‌ها mtDNA موجود در فرآورده‌های مختلف را مورد ارزیابی کمی قرار دادند که در نتیجه آن توانستند mtDNA را در تمام این محصولات از جمله پلاکت‌ها شناسایی کنند (۱۵).

به علاوه یاسویی و همکارانش دریافتند که در محصولات خونی گزارش شده از عارضه NHTRs غلظت متوسط mtDNA در کنسانتره‌های پلاکتی در مقایسه با FFP و RBC بالاست، هم‌چنین DAMPs موجود در کنسانتره‌های پلاکتی عامل NHTRs، برای فعال کردن نوتروفیل‌ها، منوسیت‌ها و بازوفیل‌ها به اندازه کافی، زیاد می‌باشد در نتیجه از نظر آن‌ها mtDNA مشتق از پلاکت، جزو کاندیداهای ایجاد NHTRs است (۱). در مطالعه دیگری نیز عنوان شد مهم‌ترین مشخصه در مورد پلاکت‌هایی که در ارتباط با NHTR هستند، زمان ذخیره و نگهداری آن‌ها نیست بلکه میزان پلاکت در هر تزریق است (۱۶).

باکور و همکارانش بیان کردند تغییرات زیادی که در میزان mtDNA حتی با بیش از ۱۰۰ fold در بین روش‌های مختلف تولید فرآورده‌های گلبول قرمز وجود دارد، احتمالاً می‌تواند منعکس‌کننده میزان آسیب سلولی که در روش‌های مختلف ایجاد شده است، باشد. mtDNA افزایش یافته به علت ذخیره‌سازی، احتمالاً می‌تواند وابسته به حضور باقی‌مانده گلبول‌های سفید و پلاکت‌های باقی‌مانده

نتیجه‌گیری

میزان mtDNA در روز اول افزایش و طی روزهای نگهداری فرآورده‌های PRP تغییر یافت و در روزهای مختلف ۱، ۳ و ۵ این تغییرات به صورت کاهشی مشاهده گردید ولی در کل می‌توان گفت در حال حاضر مکانیسم مشخصی برای افزایش یا کاهش در میزان mtDNA در محصولات خونی مطرح نشده است و به مطالعه‌های بیشتری در این باره نیاز است. این مطالعه اولین مطالعه راجع به mtDNA در محصولات خونی است که در ایران انجام شده است و با توجه به اهمیت این موضوع، نیاز به مطالعه‌های بیشتر روی سایر فرآورده‌ها و همچنین روی محصولاتی که تزریق آن‌ها با واکنش‌های انتقال خونی همراه بوده، می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته خونشناسی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق (IR.TMI.REC.1397.011) می‌باشد. بودجه این مطالعه توسط مؤسسه آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و تهیه فرآورده توسط بخش نوآوری سازمان و همه مراحل عملی پروژه در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون انجام شده است.

ذخیره‌سازی آزاد می‌شود و در هر دو گروه کنترل و بیماران تجمع یافته و سپس کاهش می‌یابد تا به حد غیر قابل اندازه‌گیری می‌رسد. اما در بیماران دچار عارضه میزان mtDNA در روز چهارم افزایش یافته و سپس کاهش پیدا می‌کند تا به میزان اولیه آن می‌رسد (۲۰). در این مطالعه نیز آزادسازی و افزایش mtDNA را در روز اول و بعد کاهش آن را در روزهای ذخیره‌سازی کیسه‌های پلاکتی مشاهده نمودیم. گرچه مطالعه کوگناس بر روی کیسه‌های آفرزیس صورت گرفته بود که عنوان شده شاید فرآیند آفرزیس سبب آزادسازی mtDNA گردیده است. البته با توجه به آن که بررسی آن‌ها در دو گروه بیماران و کنترل بود، میزان IL-13, sCD40L را نیز اندازه‌گیری نمودند و متوجه ارتباط بین mtDNA و BRMs (پاسخ اصلاح شده بیولوژیک) شدند (۲۰).

در مطالعه ما نیز نه تنها وجود mtDNA بلکه تغییرات آن در طی زمان، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به آن که اکثر مطالعه‌ها بر روی بیماران و نتیجه تزریق فرآورده‌های خون و عوارضی همانند TRALI و NHTR بوده، می‌توان گفت که یکی از محدودیت‌های مطالعه ما شاید عدم بررسی فرآورده‌های تزریقی در بیماران دچار عارضه بوده است. اگر چه در ابتدا با توجه به محدودیت‌های موجود هدف تنها بررسی mtDNA در فرآورده پلاکت بود.

References:

- 1- Yasui K, Matsuyama N, Kuroishi A, Tani Y, Furuta RA, Hirayama F. Mitochondrial damage-associated molecular patterns as potential proinflammatory mediators in post-platelet transfusion adverse effects. *Transfusion* 2016; 56(5): 1201-12.
- 2- Zadsar M, Naserani Pour M, Chegini A, Lotfi A, Mojtavavi Naeni M. Platelet consumption, indications, transfusion triggers, and response to treatment in hospital wards in Tehran. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2015; 12(2): 163-72. [Article in Farsi]
- 3- Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol* 2008; 142(3): 348-60.
- 4- Land WG. Transfusion-related acute lung injury: the work of DAMPs. *Transfus Med Hemother* 2013; 40(1): 3-13.
- 5- Simmons JD, Lee YL, Pastukh VM, Capley G, Muscat CA, Muscat DC, *et al.* Potential contribution of mitochondrial (mt) DNA damage associated molecular patterns (DAMPs) in transfusion products to the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS) after multiple transfusions. *J Trauma Acute Care Surg* 2017; 82(6): 1023-9.
- 6- Schwartz RS, Conley CL. Blood. In: *Encyclopedia Britannica*. Available from: <https://www.britannica.com/science/blood-biochemistry/additional-info#contributors>.
- 7- Baaten CCFMJ, Moenen FCJ, Henskens YMC, Swieringa F, Wetzels RJH, van Oerle R, *et al.* Impaired mitochondrial activity explains platelet dysfunction in thrombocytopenic cancer patients undergoing chemotherapy. *Haematologica* 2018; 103(9): 1557-67.
- 8- Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol* 2015; 6: 422.
- 9- Boudreau LH, Duchez AC, Cloutier N, Soulet D, Martin N, Bollinger J, *et al.* Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal

- group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* 2014; 124(14): 2173-83.
- 10- Cognasse F, Payrat JM, Corash L, Osselaer JC, Garraud O. Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand. *Blood* 2008; 112(12): 4779-80.
 - 11- Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Rainer TH, *et al.* Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem* 2003; 49(5): 719-26.
 - 12- Bakkour S, Acker JP, Chafets DM, Inglis HC, Norris PJ, Lee TH, Busch MP. Manufacturing method affects mitochondrial DNA release and extracellular vesicle composition in stored red blood cells. *Vox Sang* 2016; 111(1): 22-32.
 - 13- Hotz MJ, Qing D, Shashaty MG, Zhang P, Faust H, Sondheimer N, *et al.* Red blood cells homeostatically bind mitochondrial DNA through TLR9 to maintain quiescence and to prevent lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 197(4): 470-80.
 - 14- Luring AS, Lee T-H, Martin JN, Hunt PW, Deeks SG, Busch M. Lack of evidence for mtDNA as a biomarker of innate immune activation in HIV infection. *PLoS One* 2012; 7(11): e50486.
 - 15- Lee YL, King MB, Gonzalez RP, Brevard SB, Frotan MA, Gillespie MN, *et al.* Blood transfusion products contain mitochondrial DNA damage-associated molecular patterns: a potential effector of transfusion-related acute lung injury. *J Surg Res* 2014; 191(2): 286-9.
 - 16- Kaufman RM, Assmann SF, Triulzi DJ, Strauss RG, Ness P, Granger S, *et al.* Transfusion-related adverse events in the Platelet Dose Study. *Transfusion* 2015; 55(1): 144-53.
 - 17- Tung JP, Fraser JF, Nataatmadja M, Colebourne KI, Barnett AG, Glenister KM, *et al.* Age of blood and recipient factors determine the severity of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Crit Care* 2012; 16(1): R19.
 - 18- Heddle NM. Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Curr Opin Hematol* 1999; 6(6): 420-6.
 - 19- Sayah DM, Looney MR, Toy P. Transfusion reactions: newer concepts on the pathophysiology, incidence, treatment, and prevention of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Clin* 2012; 28(3): 363-72.
 - 20- Cognasse F, Aloui C, Anh Nguyen K, Hamzeh-Cognasse H, Fagan J, Arthaud CA, *et al.* Platelet components associated with adverse reactions: predictive value of mitochondrial DNA relative to biological response modifiers. *Transfusion* 2016; 56(2): 497-504.

Original Article

Evaluation of mitochondrial DNA during platelet storage prepared by platelet rich plasma

Vakili L.¹, Chegini A.¹, Samiei Sh.¹, Shaiegan M.¹

²*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Platelet activation occurs for a variety of reasons from the moment of sampling to that of injection. Activation of the platelets leads to activation of mitochondria. They move toward the membrane, sprouting and shedding freely from it, leading to the release of pro inflammatory mediators and mtDNA. Therefore, mtDNA level is considered as one of the parameters of platelet activity. The aim of this study was to compare mtDNA levels during storage.

Materials and Methods

This experimental study was performed on 22 PRP products. We obtained consent of all donors referring to Iran Innovation Center of Iranian Blood Transfusion Organization. Samples were taken from the PRP bags on day 1, 3 and 5. Then, the fold change of mtDNA was assessed by Real time PCR. The results were analyzed by paired t-test and the P value of less than 0.05 was considered significant.

Results

The rate of mtDNA decreased 0.8-fold on day 3 to 1, 0.6-fold on day 5 to 3, and 0.49 on day 5 to 1. These changes were significant on days 5 to 1 ($p=0.003$) and they were not significant on days 3 to 1 ($p=0.4$).

Conclusions

The amount of mtDNA increased on the first day, and then decreased during the storage of PRP products.

Key words: Real-Time Polymerase Chain Reaction, DNA, Platelet-Rich Plasma

Received: 2 Jun 2020

Accepted: 9 Feb 2021

Correspondence: Chegini A., MD. Specialist in Anesthesiology. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052256; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: a.chegini@ibto.ir