خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۰ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۲ (۱۳۳-۱۲۳)

مقاله پژوهشی

تغییرات میزان میتوکندریال DNA طی نگهداری در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم و گلبول قرمز کم لکوسیت

پویا علوی[۱]، آزیتا چگینی[۲]، شهرام سمیعی[۳]، مستانه علایی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

وجود میتوکندریال DNA در فرآورده‌های خونی می‌تواند باعث تغییرات فیزیولوژیک سلول‌ها و در نهایت بروز عوارض در بیماران گردد. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر مدت زمان ذخیره‌سازی بر روی تعداد نسخه میتوکندریال DNA آزاد در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی مقطعی، تعداد ۱۵ واحد گلبول قرمز متراکم تهیه شده از خون کامل و ۱۵ عدد گلبول قرمز کم لکوسیت وارد مطالعه شدند. پس از ارزیابی پارامترهای هماتولوژیک در هر کیسه با استفاده از روش RT-PCR تعداد نسخه میتوکندریال DNA آزاد، در فرآورده‌های خون در روزهای ۰ ، ۵ و ۳۵ انجام گردید. پس از جمع‌آوری داده‌ها، آزمایش شاپیرو و من‌ویتنی انجام و تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار REST ۲۰۰۹ صورت گرفت.

یافته‌ها

میانگین هموگلوبین در کیسه‌های خون gr/dL ۴/۳ ± ۱۷/۶ بود. میانگین پلاکت در کیسه‌های گلبول قرمز نیز ۵۰/۶۰ ± ۱۳۲/۰۲ هزار در میلی‌متر مکعب خون، هم‌چنین میانگین شمارش گلبول‌های قرمز نیز ۰/۱۴ ± ۶/۰۷ میلیون در هر میکرولیتر خون و میانگین شمارش گلبول‌های سفید در کیسه خون نیز ۲/۳ ± ۴/۹۸ در میکرولیتر بود. تعداد نسخه میتوکندریال DNA آزاد در فرآورده گلبول قرمز متراکم در مقایسه با فرآورده گلبول قرمز کم لکوسیت در روزهای ۵ و ۳۵ بیشتر بود.

نتیجه گیری

تعداد نسخه میتوکندریال DNA آزاد در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم بیشتر از گلبول قرمز کم لکوسیت بود و ارتباط مستقیمی بین میزان WBC و تعداد نسخه میتوکندریال DNA آزاد وجود دارد.

کلمات کلیدی: گلبول‌های قرمز، میتوکندریال، ژن‌ها

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

مقدمه

۱۱ درصد بیماران بستری شده در بیمارستان(تقریباً یک نفر از هر ۱۰ نفر) به تزریق خون نیاز دارند(۱). بنابراین تهیه خون کافی و سالم ارتباط مستقیمی با سلامت عمومی جامعه دارد. اما علی‌رغم این نقش حیاتی، انتقال خون به عنوان یک شمشیر دو لبه عمل می‌کند و ممکن است عوارضی اعم از ایمونولوژیک و غیر ایمونولوژیک داشته باشد. واکنش‌های ایمونولوژیک شامل آسیب حاد ریوی مرتبط با انتقال خون(TRALI)، واکنش‌های همولیتیک، واکنش‌های آلرژیک، واکنش‌های تب‌زا، بیماری پیوند علیه میزبان ناشی از انتقال خون، پورپورای ناشی از انتقال خون و ایمونومودولاسیون(immunomodulation) هستند. واکنش غیر ایمونولوژیک شامل انتقال عوامل عفونی، گرانباری گردش خون، همولیز فیزیکی و شیمیایی و کاهش فشار خون می‌باشند(۲). TRALI یک واکنش خطرناک ناشی از انتقال خون است که به صورت حاد رخ داده و با ادم ریوی به دنبال تزریق فرآورده‌های خونی همراه است(۳). علی‌رغم مطالعه‌های زیاد، هنوز پاتوفیزیولوژی TRALI به صورت کامل شناسایی نشده و به همین دلیل درمان آن عموماً به صورت غیر اختصاصی و حمایتی است. برای مدت طولانی، علت بروز TRALI، وجود لکوآگلوتینین (آنتی‌بادی‌ها) فرد اهداکننده علیه آنتی‌ژن‌های HLA و HNA فرد گیرنده در نظر گرفته می‌شد. ولی این فرضیه مورد شک قرار گرفت، زیرا تنها درصد کمی از پلاسمای اهداکنندگان دارای آنتی‌بادی‌های ضد HNA و HLA هستند(۴). به تدریج ایده دیگری در خصوص وجود واسطه‌های بیوشیمیایی و التهابی مثل میکروپارتیکل‌ها و الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب(DAMP : Damage Associated molecular pattern) به عنوان تحریک واکنش TRALI در نظر گرفته شد(۵).

فرآورده‌های کنسانتره گلبول قرمز به عنوان پر کاربردترین فرآورده‌های خونی در درمان بسیاری از اختلالات خونی و غیر خونی استفاده می‌شود. امروزه مدت زمان نگهداری کنسانتره گلبول قرمز، بسته به مواد افزوده شده به کیسه فرآورده بین ۳۵ تا ۴۲ روز است. آسیب‌های گلبول قرمز حین نگهداری که به نام آسیب دوران ذخیره‌سازی شناخته می‌شوند، برای مدت‌های طولانی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و با این حال اهمیت بالینی این آسیب‌ها هنوز به صورت کامل شناسایی نشده است. آسیب دوران ذخیره‌سازی باعث کاهش عملکرد گلبول‌های قرمز می‌شوند که از جمله می‌توان به کاهش انعطاف‌پذیری، کاهش قابل توجه ATP و در نتیجه کاهش توانایی گلبول‌های قرمز برای اکسیژن‌رسانی اشاره کرد. هم‌چنین استرس اکسیداتیو یکی از شایع‌ترین آسیب‌های دوران ذخیره‌سازی است که با افزایش عوارض ناشی از انتقال خون پس از تزریق گلبول قرمز همراه است(۶). DAMP ها که به عنوان آلارمین‌ها نیز شناخته می‌شوند، گروهی از بیومولکول‌های وابسته به میزبان هستند که در شرایط خاص مثل تروما، آسیب بافتی و استرس سلولی رها می‌شوند و به عنوان سیگنال‌های خطر اندوژن عمل کرده و باعث القای پاسخ التهابی از طریق فعال کردن سیستم ایمنی طی التهاب غیر عفونی می‌شوند(۸، ۷). از جمله مهم‌ترین انواع DAMP ها می‌توان به DNA (اعم از DNA ژنومی و DNA میتوکندریایی) متابولیت‌های پورینی و پروتئین گروه با تحرک بالا(HMGB ؛ High-mobility group protein) اشاره کرد. بر اساس مطالعه‌ها نشان داده شده که DNAs به همراه HMGB1 ها می‌توانند در بسیاری از واکنش‌های بیولوژیکی دخیل باشند و این فاکتورها می‌توانند بر روی واکنش‌های التهابی و هم‌چنین تحریک سیستم ایمنی اثرگذار بوده و به واسطه فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ NF-kB باعث تولید واسطه‌های التهابی گردند.

میتوکندری‌ها به عنوان کارخانه انرژی سلول شناخته می‌شوند، اندامک‌های منحصر به فردی هستند که دارای DNA اختصاصی(mtDNA) می‌باشند. mtDNA انسانی به صورت DNA دو رشته‌ای حلقوی بوده و دارای ۱۶۵۲۹ جفت باز است و rRNA و tRNA میتوکندریایی و نیز ۱۳ واحد از پروتئین‌های زنجیره تنفسی را کد می‌کند(۹). طی استرس‌های سلولی و میتوکندریایی، قطعاتی از mtDNA جدا شده و وارد گردش خون می‌شود که به عنوان mtDNA DAMPs خوانده می‌شوند. mtDNA DAMPs با اتصال به TLR-9 (Toll Like Receptor-9) منجر به فعال شدن فرآیند التهابی می‌شود (۱۰). مطالعه‌های مختلف نشان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

داده‌اند که سطح mtDNA DAMPs در پلاسمای بیماران مبتلا به سندروم پاسخ التهابی سیستمی ناشی از تروما افزایش می‌یابد و با افزایش میزان مرگ و میر همراه است(۱۲، ۱۱). هم‌چنین سطح mtDNA DAMPs در بیماران مبتلا به سپسیس و سندروم دیسترس تنفسی حاد(ARDS) افزایش می‌یابد و با افزایش مرگ و میر همراه است(۱۳).

مطالعه‌های آزمایشگاهی در سطح کشت سلولی و حیوانات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که mtDNA DAMPs منجر به آسیب سلول‌های اندوتلیال و ادم ریوی می‌شوند(۱۴، ۱۲). طی فرآیند تهیه فرآورده‌های RBC، پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید به مقادیر مختلف در فرآورده باقی می‌مانند و می‌توانند به عنوان منبعی برای رهاسازی mtDNA DAMPs عمل کنند. با توجه به موارد ذکر شده، وجود mtDNA DAMPs در فرآورده خونی می‌تواند به عنوان یکی از مارکرهای کیفیت فرآورده و عوامل تحریک‌کننده آسیب سلول‌های اندوتلیال و بروز واکنش TRALI عمل کند. با توجه به این که هنوز مطالعه‌ای در زمینه ارزیابی میزان mtDNA DAMPs و مقایسه آن در فرآورده‌های گلبول قرمز تهیه شده به روش‌های مختلف در ایران انجام نشده، هدف از این پژوهش، ارزیابی سطح mtDNA DAMPs در فرآورده‌های گلبول قرمز کم لکوسیت در مقایسه با گلبول قرمز متراکم (بدون کاهش لکوسیت) طی زمان نگهداری در روزهای ۰، ۵ و ۳۵ بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی مقطعی بود. در این مطالعه واحدهای گلبول قرمز فرآوری شده با روش سانتریفوژ از خون کامل(شامل PRBCs وکم لکوسیت) اهداکنندگان مراجعه‌کننده به مرکز نوآوری‌های سازمان انتقال خون ایران تهیه گردید. بر روی تعداد ۱۵ واحد گلبول قرمز متراکم تهیه شده از خون کامل و ۱۵ عدد گلبول قرمز کم لکوسیت از اهداکنندگان داوطلب با کسب رضایتنامه آگاهانه جهت استفاده محصول در کار تحقیقاتی بررسی انجام شد(۱۵). خونگیری با رعایت اصول صحیح و به صورت استریل از اهداکنندگان مستمر انجام گرفت. معیار ورود به مطالعه اهداکنندگان جنس مرد، سن ۳۵ تا ۵۰ سال و با هموگلوبین ۱۳ تا ۱۶ بودند تا کیسه‌های گلبول قرمز دارای شرایط یکسانی باشند و انتخابی از نظر گروه خونی صورت نگرفت.

سپس تمامی کیسه‌های قابل نگهداری تا ۳۵ روز(حاوی ماده ضد انعقاد CPDA1)، در شرایط استاندارد در یخچال ویژه بانک خون با دمای ۶-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری و مرتباً زنجیره سرمای آن کنترل و در چارت مخصوص ثبت گردید. شماره و برچسبی خاص بر روی کیسه‌های مختلف گلبول قرمز تهیه و چسبانیده شدند. در واقع به هر کیسه، کد شناسه مخصوص این مطالعه اختصاص داده شد. هم چنین تاریخ تهیه و تحویل فرآورده در چک لیست‌های مخصوص ثبت گردید. نمونه‌گیری از تمامی کیسه‌ها با شرایط استریل، به روشی همانند و در سیستم بسته صورت گرفت و در دمای ۲ تا ۴ درجه به آزمایشگاه منتقل شد و توسط سل کانتر کالیبره از نظر شمارش گلبول سفید، پلاکت و گلبول قرمز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه بین خون تازه(تا ۵ روز) و آخرین روزی که امکان استفاده گلبول قرمز متراکم هست، در روزهای ۵ و ۳۵ نمونه‌برداری از کیسه‌ها انجام گرفت. نمونه‌های گرفته شده به مدت ۲۰ دقیقه در دور g ۲۵۰۰ و در دمای ۴-۲ درجه سانتریفوژ شده و سوپرناتانت در کرایو ویال ریخته شده و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شدند.

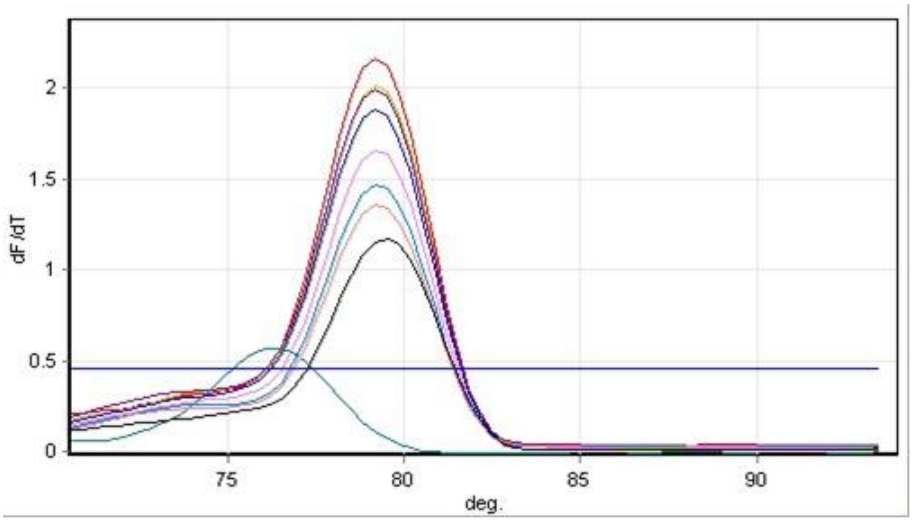
در ابتدا mtDNA برای کنترل مثبت واکنش Real-time PCR و رسم منحنی استاندارد تهیه گردید. استخراج mtDNA با استفاده از کیت qiamp blood DNA mini kit (کیاژن ـ آلمان) صورت گرفت.

آغازگرها(پرایمرها) به صورت لیوفیلیزه و هر کدام از آن‌ها با استفاده از محلول(Tris-acetate-EDTA) TAE به غلظت µM ۱۰۰ رسانیده شد و ۲ تا ۳ دقیقه ورتکس فیوژ گردید و محلول استوک به دست آمد. برای هر چند بار استفاده آغازگرهای استوک با استفاده از آب مقطر استریل، اتوکلاو شده به غلظت µM ۱۰ رسانده شدند. سپس برای ND6 (NADH دهیدروژناز زیر واحد ۶) که اختصاصی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

جدول ۱: لیست آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

عنوان	آغازگر	توالی('3 ⟵ '5)	اندازه	محتوای GC (%)	دمای ذوب Tm ˚C
ND6	F.primer	CCA TCG CTG TAG TAT CC AA	۱۵۰	۴۲	۶۰/۹
	R.primer	TCG GGT GTG TTA TTA TTC TGA		۳۸	۶۰/۷
B2M	F.primer	TGT TCC TGC TGG GTA GCT CT	۱۸۷	۵۵	۶۰
	R.primer	CCT CCA TGA TGC TGC TTA CA		۵۰	۵۸



شکل ۱: منحنی دمای ذوب ND6

جدول ۲: مقادیر مورد نیاز برای واکنش

ماده	حجم مورد نیاز (µL)
Qpcr green master mix with low ROX(2X)	۵
Primer forward (10µM)	۰/۵
Primer reverse(10µM)	۰/۵
PCR-grade water	۱
DNA	۳

mtDNA می‌باشد، طبق جداول ۲، ۳، RT PCR با سایبرگرین انجام شد و منحنی‌های تکثیر و منحنی‌های ذوب این آغازگر تجزیه و تحلیل گردیدند(شکل ۱)(جداول ۲ و ۳).

جهت انجام Real time PCR برای ژن هدف *ND6* و رفرانس ژن *B2M* (*Beta-2-Microglobulin*) انتخاب شده طبق دستورالعمل کیت Jena (بیوساینس) مسترمیکس، آغازگر و آب مقطر بر روی یخ به میکروتیوب اضافه شد. قابل ذکر است که پیش از استفاده از مسترمیکس و آغازگرها و پس از اضافه شدن هر کدام از اجزای واکنش، میکروتیوب ورتکس فیوژ می‌گردید.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

جدول ۳: برنامه دمایی و زمانی Real-time PCR

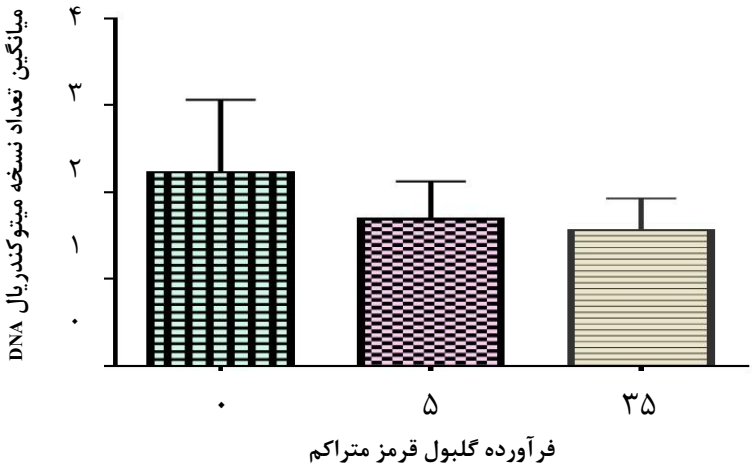
	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
Initial denaturation	۹۵	۱۲۰
Denaturation	۹۵	۱۵
Annealing and elongation	۶۰	۳۵

برای تهیه منحنی استاندارد برای ژن‌های *ND6* و *B2M* و تعیین کارآیی آغازگرها پس از تهیه رقت‌های سریالی برای محصولات ژن‌های *B2M* و *ND6* ، برای هر رقت، Real-time PCR به صورت داپلیکیت انجام گردید و برای هر ران کاری کنترل منفی(NTC) نیز گذاشته شد. سپس منحنی استاندارد توسط نرم‌افزار Rotor-gene به صورت خودکار رسم گردید و میزان کارآیی هر آغازگر محاسبه شد. برای نمونه‌های DNA استخراج شده در روزهای ۰، ۵ و ۳۵ کیسه‌های مورد و کنترل طبق دستورالعمل‌های ذکر شده برای ژن هدف و رفرانس ژن، Real-time PCR به صورت داپلیکت انجام شد. پس از تکثیر mtDNA و ژن کنترل داخلی و تجزیه و تحلیل اختصاصیت توسط منحنی ذوب و بررسی عدم وجود آلودگی با توجه به منحنی تکثیر NTC ، طبق منحنی استاندارد و فرمول، تعداد کپی‌های mtDNA به صورت کمی مطلق محاسبه گردید.

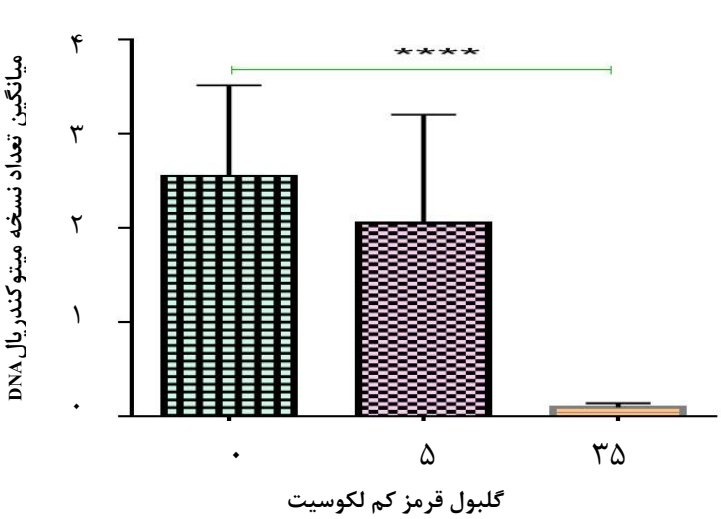
یافته‌ها

نتایج نشان داد که میانگین هموگلوبین در کیسه‌های خون مورد بررسی ۴/۳ ± ۱۷/۶ گرم در دسی‌لیتر بود. میانگین پلاکت در آن‌ها نیز ۵۰/۶۰ ± ۱۳۲/۰۲ هزار در میلی‌متر مکعب خون و هم چنین میانگین شمارش گلبول‌های قرمز نیز ۰/۱۴ ± ۶/۰۷ میلیون در هر میکرولیتر خون و در نهایت میانگین شمارش گلبول‌های سفید در تمامی کیسه‌های خون مورد بررسی نیز ۲/۳ ± ۴/۹۸ به ازای هر میکرولیتر از خون به دست آمد. بررسی ارتباط میزان سطح mtDNA در گروه‌های گلبول قرمز متراکم و گلبول قرمز کم لکوسیت و در روزهای صفر، ۵ و ۳۵ و مقایسه میانگین تعداد نسخه DNA میتوکندریال آزاد (کپی نامبر mtDNA) در دو گروه گلبول قرمز متراکم و گلبول قرمز کم لکوسیت انجام شد. نتایج نشان داد که میانگین کپی نامبر mtDNA در روز صفر در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم ۰/۸۳ ± ۲/۲۲۷ بود در حالی که در فرآورده گلبول‌های قرمز کاهش لکوسیت یافته ۱/۲۳ ± ۲/۵۵۲ مشاهده گردید. میزان تغییرات ND6 در روز پنجم در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم ۰/۷۳ ± ۱/۶۸۷ بود در حالی که در فرآورده گلبول‌های قرمز کاهش لکوسیت یافته ۱/۳۸ ± ۲/۰۴۹ بود. هم چنین میزان تغییرات ND6 در روز ۳۵ در فرآورده‌های گلبول‌های قرمز متراکم ۰/۶۲ ± ۱/۵۶۶ بود در حالی که در فرآورده گلبول‌های قرمز

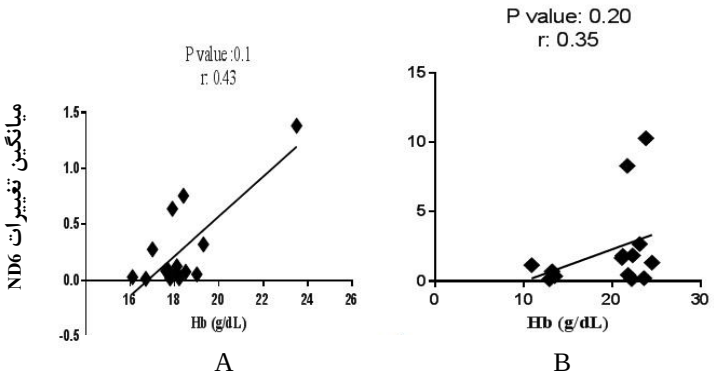
A



[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]



شکل ۲: میانگین تغییرات ND6 در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت. A) در فرآورده گلبول قرمز متراکم، B) در فرآورده گلبول قرمز کم لکوسیت

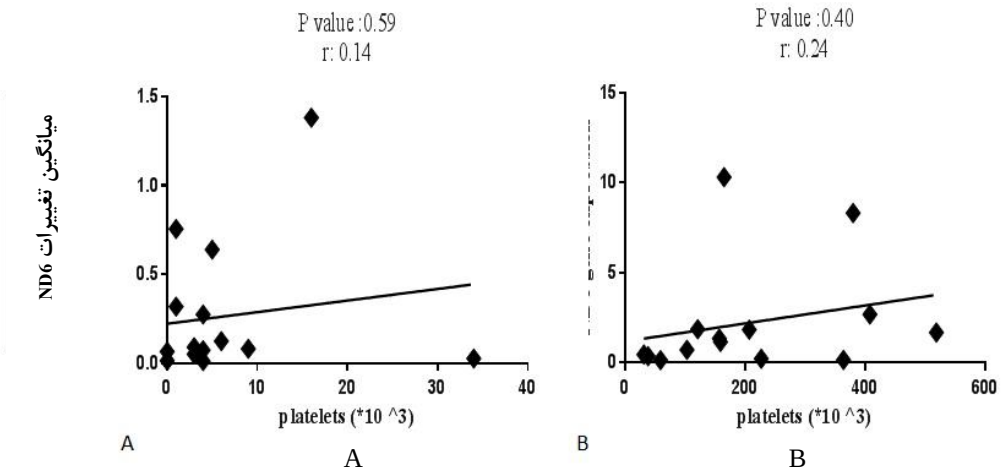


شکل۳: ارتباط میزان تغییرات ND6 با میزان Hb. A) در فراورده گلبول قرمز متراکم و B) فراورده گلبول قرمز کم لکوسیت

کم لکوسیت یافته ۰/۰۰۳۶ ± ۰/۰۹۶۷۵ بود. در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که ارتباط معناداری بین میزان تغییرات ND6 در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم در روزهای صفر، پنج و ۳۵ از زمان ذخیره‌سازی وجود نداشت این در حالی بود که ارتباط معناداری بین میزان تغییرات ND6 در فرآورده‌های گلبول قرمز کم لکوسیت یافته مشاهده گردید($p< ۰/۰۰۰۱$)(شکل ۲). نتایج نشان داد که میزان تغییرات ND6 با میزان Hb در هر دو فرآورده گلبول قرمز و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت ارتباط داشت به طوری که هر چه میزان Hb بیشتر بود، میزان تغییرات ND6 نیز افزایش پیدا کرده بود. با این حال ارتباط معناداری بین آن‌ها از نظر آماری وجود نداشت (شکل۳).

هم چنین میزان تغییرات ND6 با میزان پلاکت در هر دو فرآورده گلبول قرمز متراکم و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت یافته ارتباط داشت به طوری که هر چه میزان پلاکت بیشتر بود میزان تغییرات ND6 نیز افزایش پیدا کرده بود. با این حال ارتباط معناداری بین آن‌ها از نظر آماری وجود نداشت (شکل۴). ارتباط مستقیمی بین میزان تغییرات ND6 و تعداد

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]



شکل ۴: ارتباط میزان تغییرات ND6 با میزان پلاکت. A) در فرآورده گلبول قرمز متراکم و B) فرآورده گلبول قرمز کم لکوسیت

WBC در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت وجود داشت ولی این ارتباط بین آن‌ها از نظر آماری معنادار نبود.

بحث

فرآورده‌های خونی یکی از فاکتورهای اصلی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری سیکل سل، تالاسمی و بسیاری از بیماری‌های دیگر می‌باشد. استفاده از فرآورده‌های خون برای درمان بیماران نتایج قابل قبولی داشته و در بسیاری از شرایط باعث بهبود وضعیت بالینی آن‌ها می‌گردد(۱۶). این در حالی است که استفاده از این فرآورده‌ها در شرایطی می‌تواند دارای یک سری عوارض خاص برای بیماران باشد. بر اساس مطالعه‌ها نشان داده شده که عدم سازگاری فرآورده‌های خونی بین دهنده و گیرندگان می‌تواند باعث بروز واکنش‌های ناشی از تزریق خون در گیرندگان خون گردد(۱۷). علاوه بر بروز واکنش‌های ناشی از تزریق خون، ذخیره‌سازی فرآورده‌های خون نیز می‌تواند در بروز واکنش‌های ناشی از تزریق خون مؤثر باشد. بدین منظور مطالعه‌ها نشان داده‌اند که ذخیره‌سازی فرآورده‌های خون می‌تواند بر روی سلول‌های خونی و هم چنین سیستم ایمنی و سیستم فیزیولوژیکی گیرندگان خون تأثیرگذار باشد. یکی از فاکتورهایی که در طول ذخیره‌سازی در فرآورده‌های خون از جمله کیسه‌های گلبول قرمز متراکم و پلاکت تولید می‌گردد، mtDNA می‌باشد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که mtDNA می‌تواند به عنوان یک فاکتور مولکول‌های پاتوژن مرتبط با آسیب یا DAMP باشد و باعث تحریک سیستم ایمنی و القای واکنش‌های التهابی گردد(۱۸). از طرفی نشان داده شده که تزریق فرآورده‌های خون حاوی mtDNA به بیماران می‌تواند بر روی سیستم ایمنی آن‌ها تاثیرگذار باشد و باعث وخیم‌تر شدن شرایط بالینی آن‌ها گردد. تاکنون مطالعه‌های بسیار کمی در ارتباط با میزان کپی نامبر mtDNA در فرآورده‌های خون گلبول قرمز متراکم انجام شده است. با این حال اطلاعات به دست آمده دارای نتایج ضد و نقیضی می‌باشد و نتیجه‌گیری کلی در ارتباط با میزان کپی نامبر mtDNA در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم(packed cell) ارایه نکرده‌اند. ما در این مطالعه به ارزیابی میزان کپی نامبر mtDNA در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت و ارتباط آن با مدت زمان ذخیره‌سازی فرآورده‌ها پرداختیم.

بر روی تعداد ۱۵ واحد گلبول قرمز متراکم تهیه شده از خون کامل و ۱۵ عدد گلبول قرمز کم لکوسیت از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

اهداکنندگان تحقیق انجام گردید. هدف از مطالعه، ارزیابی میزان mtDNA در این فرآورده‌های خون در روزهای صفر، پنج و ۳۵ روز پس از ذخیره‌سازی آن‌ها بود. قبل از اندازه‌گیری کپی نامبر mtDNA ، برخی از اندکس‌های شمارش کامل گلبول‌های قرمز در کیسه‌های خون مورد ارزیابی قرار گرفت که به شرح زیر می‌باشد. بر این اساس نتایج نشان داد که میانگین هموگلوبین در کیسه‌های خون ۴/۳ ± ۱۷/۶ گرم در دسی‌لیتر و میانگین پلاکت نیز ۵۰/۶۰ ± ۱۳۲/۰۲ هزار در میلی‌متر مکعب خون بود. هم‌چنین میانگین شمارش گلبول‌های قرمز نیز ۰/۱۴ ± ۶/۰۷ میلیون در هر میکرولیتر خون بود. و در نهایت میانگین شمارش گلبول‌های سفید در کیسه خون نیز ۲/۳ ± ۴/۹۸ به ازای هر میکرولیتر از خون بود. میزان کپی نامبر mtDNA در فرآورده گلبول قرمز متراکم در مقایسه با فرآورده‌های گلبول قرمز کم لکوسیت در روزهای ۵ و ۳۵ روز از ذخیره‌سازی فرآورده‌ها بیشتر بود که این اختلاف بین آن‌ها از نظر آماری هم معنادار بود($p< ۰/۰۵$).

مطالعه‌ای توسط لی و همکاران انجام گرفت. در این مطالعه هدف بررسی میزان mtDNA در فرآورده‌های گلبول قرمز، پلاکت و پلاسمای تازه منجمد بود. mtDNA که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته بود شامل COX1 ، ND1 و ND6 بود. نشان داده شد که میزان mtDNA در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم، فرآورده‌های پلاسمایی و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت افزایش یافته بود در حالی که بیشترین میزان mtDNA در فرآورده‌های پلاسمایی وجود داشت. پس از بررسی‌های بیشتر نشان داده شد که افزایش میزان mtDNA در فرآورده‌های خون می‌تواند همراه با بروز عوارض آسیب ریوی مرتبط با تزریق خون در بیماران باشد. در نهایت آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که افزایش میزان mtDNA در فرآورده‌های خون همراه با بروز آسیب‌های ریوی حاد مرتبط با تزریق خون در بیماران است(۱۹).

سیمونس و همکاران مطالعه‌ای به منظور ارزیابی میزان DAMP (mtDNA) در فرآورده‌های خون شامل گلبول‌های قرمز، پلاسمای تازه منجمد و فرآورده‌های پلاکتی انجام دادند. پس از ارزیابی‌ها نتایج نشان داد که میزان mtDNA در فرآوده‌های پلاکتی و پلاسمایی در مقایسه با سایر فرآورده‌ها بیشتر بود. هم چنین آن‌ها نشان دادند که افزایش میزان mtDNA در طول دوران نگهداری در فرآورده‌های خون همراه با افزایش میزان بروز سندروم زجر تنفسی در بیماران بود. از این رو این طور نتیجه‌گیری کردند که افزایش میزان mtDNA در فرآورده‌های خون در طول ذخیره‌سازی می‌تواند همراه با خطر بروز عوارض در بیماران باشد که نیازمند اتخاذ استراتژی‌های مناسب در طول درمان بیماران با استفاده از فرآورده‌های خون می‌باشد(۲۰). مطالعه‌ای که توسط شی و همکاران به منظور مقایسه میزان mtDNA در گلبول‌های قرمز کامل فیلتر شده و فرآورده گلبول‌های قرمز متراکم فیلتر شده انجام گرفت، نشان داده شد که میزان mtDNA در فرآورده‌های خون تازه در مقایسه با فرآورده‌های خون ذخیره شده بیشتر بود. علاوه بر این مشخص گردید که میزان mtDNA در فرآورده‌های خون کامل در مقایسه با فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم بیشتر بود که این اختلاف‌ها از نظر آماری معنادار بود. به عبارت دیگر در مطالعه شی تاثیر روش‌های آماده کردن فرآورده‌های خون بر روی میزان mtDNA نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان mtDNA در فرآورده‌هایی که خون کامل قبل از تهیه فرآورده با استفاده از فیلتر به دست آمده بود در مقایسه با گلبول‌های قرمز متراکم که با استفاده از فیلتراسیون تهیه گردیده بودند بیشتر بود(۲۱). این مطالعه همسو با تحقیق ما بود.

مطالعه دیگری توسط باکور و همکاران به منظور ارزیابی میزان وزیکول‌های خارج سلولی و mtDNA در فرآورده‌های خون انجام گرفت. در این مطالعه از فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم، خون کامل، فرآورده‌های آفرزیس شده و فرآورده‌های گلبول قرمز کم لکوسیت استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان mtDNA در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم و فرآورده‌های گلبول قرمز کم لکوسیت با افزایش میزان مدت زمان ذخیره‌سازی افزایش یافته بود. بر این اساس مشخص شد میزان mtDNA در فرآورده‌هایی که به مدت ۴۲ روز ذخیره‌سازی شده بودند در مقایسه با فرآورده‌هایی که ۵ روز از زمان نگهداری آن‌ها گذشته بود، بیشتر بود که این اختلاف از نظر آماری معنادار بود($p< ۰/۰۵$)(۱۵). علاوه بر این با

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

افزایش میزان mtDNA در فرآورده‌ها، وزیکول‌های خارج سلولی نیز در فرآورده‌های خون با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی در فرآورده‌های خون افزایش یافته بود. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر همسو بود. یاسوئی و همکاران مطالعه‌ای به منظور ارزیابی میزان mtDNA در فرآورده‌های خون از جمله گلبول‌های قرمز متراکم، پلاکت‌ها، پلاسمای تازه منجمد و گلبول‌های قرمز کم لکوسیت انجام دادند. پس از ارزیابی و تجزیه و تحلیل داده‌ها نتایج نشان داد که میزان mtDNA در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم در مقایسه با سایر فرآورده‌ها بیشتر بود. هم چنین نشان داده شد که افزایش میزان mtDNA در فرآورده‌ها همراه با افزایش خطر بروز واکنش‌های غیرهمولیتیک مرتبط با تزریق خون در گیرندگان بود به طوری که هر چه میزان mtDNA در فرآورده‌ها بیشتر به دست آمد، خطر بروز عوارض در گیرندگان نیز افزایش یافت(۲۲).

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که ارتباط مستقیمی بین میزان WBC و کپی نامبر mtDNA در فرآورده‌های پکدسل و فرآورده‌های گلبول قرمز کم لکوسیت وجود داشت. هر چه میزان WBC در فرآورده‌های خون بیشتر بود میزان کپی نامبر mtDNA نیز افزایش یافته بود. مطالعه‌ای توسط تیکسترا و همکاران به منظور ارزیابی ارتباط میزان گلبول‌های سفید با میزان mtDNA در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده با روش‌های پلاسمای غنی از پلاکت و روش بافی‌کوت انجام شد. نتایج نشان داد که میزان mtDNA در فرآورده‌های کم لکوسیت در مقایسه با فرآورده‌های دیگر کمتر بود و میزان گلبول‌های سفید و قطعات آن در فرآورده‌های تهیه شده با روش بافی‌کوت در مقایسه با روش‌های دیگر همانند روش پلاسمای غنی از پلاکت بیشتر بود(۲۳). مطالعه دیگری توسط فوچز و همکاران بر روی کیسه‌های خون که از سگ‌ها جمع‌آوری شده بود، انجام گرفت. آن‌ها نشان دادند نشانگرهای NET در طول ذخیره‌سازی RBC افزایش یافت و در کیسه‌های غیر کم لکوسیت بیشتر از واحدهای کم لکوسیت بود(۲۴).

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم، تعداد نسخه میتوکندریال آزاد(Mitochondrial copy number) DNA با میزان پلاکت‌ها در فرآورده رابطه مستقیمی داشت، این در حالی بود که مشخص گردید میزان کپی نامبر mtDNA با میزان پلاکت‌ها در فرآورده‌های گلبول قرمز کم لکوسیت ارتباط داشت. به عبارت دیگر نشان داده شد که هر چه میزان پلاکت در فرآورده‌ها بیشتر باشد، میزان کپی نامبر mtDNA در فرآورده‌ها نیز افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که توسط کوگناس و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که افزایش میزان پلاکت در فرآورده‌ها همراه با افزایش میزان mtDNA بود. از طرف دیگر نشان داده شد که با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی فرآورده‌های پلاکتی، میزان mtDNA در آن‌ها افزایش می‌یابد(۲۵).

نتیجه‌گیری

تعداد نسخه mtDNA آزاد در فرآورده‌های گلبول قرمز متراکم بیشتر از کم لکوسیت بود و ارتباط مستقیمی بین میزان WBC و تعداد نسخه mtDNA آزاد مشاهده گردید. هر چه میزان پلاکت بیشتر بود، میزان تغییرات mtDNA نیز افزایش پیدا کرده بود($p< ۰/۰۰۰۱$).

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته خونشناسی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1398.024 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

References:

1- Bansod PN, Jethani N, Pachori G. Clinical use of blood and its components in tertiary health care center in northwestern India. Int J Med Sci Public Health 2015; 4: 787-91.
2- Sahu S, Hemlata AV. Adverse events related to blood transfusion. Indian J Anaesth 2014; 58(5): 543-51.
3- Toy P, Popovsky MA, Abraham E, Ambruso DR,
4- Holness LG, Kopko PM, et al. Transfusion-related acute lung injury: definition and review. Crit Care Med 2005; 33(4): 721-6.
5- Silliman CC, Boshkov LK, Mehdizadehkashi Z, Elzi DJ, Dickey WO, Podlosky L, *et al*. Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. Blood 2003; 101(2): 454-62.
6- Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, Gomez-Marin O, Horstman LH, Ahn YS. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. Transfusion 2011; 51(4): 886-93.
7- Grazzini G, Vaglio S. Red blood cell storage lesion and adverse clinical outcomes: post hoc ergo propter hoc? Blood Transfus 2012; 10(Suppl 2): s4-6.
8- Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol 2010; 10(12): 826-37.
9- Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. Front Immunol 2015; 6: 422.
10- Larsson NG. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. Annu Rev Biochem 2010; 79: 683-706.
11- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, *et al*. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. Trends Immunol 2011; 32(4): 157-64.
12- Simmon JD, Lee Y-L, Mulekar S, Kuck JL, Brevard SB, Gonzalez RP, *et al*. Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. Ann Surg 2013; 258(4): 591-6.
13- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, *et al*. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature 2010; 464(7285): 104-7.
14- Nakahira K, Kyung SY, Rogers AJ, Gazourian L, Youn S, Massaro AF, *et al*. Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. PLoS Med 2013; 10(12): e1001577.
15- Sun S, Sursal T, Adibnia Y, Zhao C, Zheng Y, Li H, *et al*. Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways. PloS One 2013; 8(3): e59989.
16- Bakkour S, Acker JP, Chafets DM, Inglis HC, Norris PJ, Lee TH, *et al*. Manufacturing method affects mitochondrial DNA release and extracellular vesicle composition in stored red blood cells. Vox Sang 2016; 111(1): 22-32.
17- Tanji N, Tanji K, Kambham N, Markowitz GS, Bell A, D'Agati VD. Adefovir nephrotoxicity: possible role of mitochondrial DNA depletion. Hum Pathol 2001; 32(7): 734-40.
18- Nakashima-Kamimura N, Asoh S, Ishibashi Y, Mukai Y, Shidara Y, Oda H, *et al*. MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. J Cell Sci 2005; 118(22): 5357-67.
19- Lepelley A, Crow YJ. Erythrocyte-derived mitochondria take to the lupus stage. Cell Metab 2021; 33(9): 1723-5.
20- Lee Y-L, 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.
21- Simmons JD, Lee Y-LL, Pastukh VM, Capley G, Muscat CA, Muscat DC, *et al*. Potential contribution of mitochondrial DNA damage associated molecular patterns in transfusion products to the development of acute respiratory distress syndrome after multiple transfusions. J Trauma Acute Care Surg 2017; 82(6): 1023-9.
22- Shih AW, Bhagirath VC, Heddle NM, Acker JP, Liu Y, Eikelboom JW, *et al*. Quantification of Cell-Free DNA in Red Blood Cell Units in Different Whole Blood Processing Methods. J Blood Transfus 2016; 2016: 9316385.
23- 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.
24- Dijkstra-Tiekstra MJ, van der Schoot CE, Pietersz RN, Reesink HW. White blood cell fragments in platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma or buffy-coat methods. Vox Sang 2005; 88(4): 275-7.
25- McQuinn ER, Smith SA, Viall AK, Wang C, LeVine DN. Neutrophil extracellular traps in stored canine red blood cell units. J Vet Intern Med 2020; 34(5): 1894-902.
26- 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2023;20 (2): 123-133

Orginal Article

Changes in the amount of mitochondrial DNA during storage in RBCs and Leukoreduced red blood cells

Alavi P.[1], Chegini A.[1], Samiee Sh.[1], Alaie M.[1]

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

Abstract

Background and Objectives

The mitochondrial DNA in blood products can cause physiological changes in cells and patient complications. This study aims to evaluate the effect of storage time on the copy number of free mitochondrial DNA in products of RBCs and leukoreduced red blood cells.

Materials and Methods

In a cross-sectional descriptive study, 15 units of RBCs and 15 units of leukoreduced red blood cells were evaluated. After determining the hematological parameters and the average blood cell count in each bag, the free mitochondrial DNA copy number was evaluated using the RT-PCR method. The mitochondrial DNA copy number was measured in blood products on days 0, 5 and 35. After data collection, Shapiro and Mann-Whitney tests were performed and the analysis was done using REST 2009 software.

Results

The average hemoglobin level in the blood bags was 17.6 ± 4.3 gr/dL. The mean platelet count in packed RBC bags was 132.02 ± 50.60×1000/mm^3 of blood. The mean number of red blood cells was 6.07 ± 0.14 million per microliter of blood and the mean WBC count in the blood bags was 4.98 ± 2.3 per microliter. The number of free mitochondrial DNA copies in the packed RBC product was higher compared to the leukocyte-less RBC products on days 5 and 35.

Conclusions

The free mitochondrial DNA copy number in RBCs bags was higher than leukoreduced RBCs, and a direct relationship between the amount of WBC and the number of free mtDNA copy number was observed.

Key words: RBCs, Mitochondrial, Genes

Received: 6 Mar 2022
Accepted: 22 May 2023

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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-08-17]