

## Evaluation of Serum miR-21 Expression Level in Patients Suspected of *Mycobacterium tuberculosis* Infection

Hessam Zendeheel Moghadam<sup>1</sup> , Babak Kheirkhah<sup>2,\*</sup> , Nadia Kazemi Pour<sup>2</sup>, Ashraf Kariminik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PhD, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

\* **Corresponding Author:** Babak Kheirkhah, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. Email: babakkheirkhah@yahoo.com

### Abstract

**Received:** 16.08.2020

**Accepted:** 09.11.2020

#### How to Cite this Article:

Zendeheel Moghadam H, Kheirkhah B, Kazemi Pour N, Kariminik A. Evaluation of Serum miR-21 Expression Level in Patients Suspected of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Avicenna J Clin Med.* 2020; 27(3): 184-192. DOI: 10.29252/ajcm.27.3.184

**Background and Objective:** *Mycobacterium tuberculosis* is an intracellular pathogen, and the main target of this bacterium is the lungs, upper respiratory system, and their mucous membranes leading to acute or chronic infection of the respiratory tract. The purpose of this study was to investigate the microRNA 21 (miR-21) expression levels in the patients suspected of *Mycobacterium tuberculosis*.

**Materials and Methods:** The present study was a case-by-case study, and the results were compared between the two groups of patients and healthy individuals. The serum samples were collected from 200 patients suspected of *Mycobacterium tuberculosis* during a 3-year period in the hospitals of Kerman, Iran. The expression level of the extracted miR-21 was analyzed using real-time polymerase chain reaction.

**Results:** There was no significant difference in the serum miR-21 gene expression in the symptomatic patients with negative smear and negative purified protein derivative (PPD) skin test. However, the patients with positive smear and negative PPD, positive PPD and negative smear, and positive smear and positive PPD showed a significant increase in the miR-21 gene expression ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The obtained results confirmed the need for more accurate diagnostic methods, especially molecular techniques, for the detection of *M. tuberculosis* infection as late detection of infection can eliminate the possibility of effective treatment and endanger the lives of individuals. Due to the correlation between miR-21 and this infection, the miR-21 inhibitors can also be used for the treatment of the disease.

**Keywords:** MicroRNAs, *Mycobacterium tuberculosis*, Smear Test, Tuberculin Test

## بررسی میزان بیان سر می miR-21 در بیماران مشکوک به عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

حسام زنده‌دل مقدم<sup>۱</sup> ID، بابک خیرخواه<sup>۲</sup> \* ID، نادیا کاظمی پور<sup>۲</sup>، اشرف کریمی نیک<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

\* نویسنده مسئول: بابک خیرخواه، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران. ایمیل: babakkheirkhah@yahoo.com

### چکیده

**سابقه و هدف:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پاتوژنی درون سلولی است که موضع و هدف اصلی آن ریه‌ها، سیستم تنفسی فوقانی و غشای مخاطی آن‌هاست که به عفونت حاد یا مزمن دستگاه تنفسی منجر می‌شود. هدف مطالعه حاضر بیان miR-21 در افراد مشکوک به عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده است.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع مورد شاهدهی بود و نتایج حاصل بین دو گروه بیمار و سالم مقایسه شد. نمونه‌های سر می از ۲۰۰ فرد مشکوک به عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس طی دوره سه ساله از بیمارستان‌های شهر کرمان جمع‌آوری شدند و پس از استخراج miR-21، میزان بیان آن با استفاده از روش Real time PCR بررسی شد.

**یافته‌ها:** تفاوت معنی‌داری در بیان سر می ژن miR-21 در افراد اسمیر منفی و PPD منفی دارای علامت وجود نداشت، اما در افراد اسمیر مثبت و PPD منفی، اسمیر مثبت و PPD مثبت، افزایش معنی‌داری در بیان ژن miR-21 وجود داشت ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** این نتایج به روش‌های تشخیصی دقیق‌تر نیاز دارد و روش‌های مولکولی را در تشخیص عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تأیید می‌کند؛ چراکه تشخیص دیر هنگام عفونت می‌تواند فرصت درمان مؤثر را از بین ببرد و جان افراد را به خطر بیندازد. همچنین با توجه به ارتباط میان miR-21 و این عفونت، می‌توان از مهارکننده‌های miR-21 نیز برای درمان بیماری استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** آزمون اسمیر، آزمون توبرکولین، مایکوباکتریوم توبرکلوز، میکرو RNAs

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۵/۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۱۹

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

### مقدمه

بیماری، تقویت سیستم ایمنی ناحیه مخاطی دستگاه تنفسی به‌عنوان محل هدف باکتری است [۲]. در سراسر جهان، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیش از هر عامل میکروبی دیگری، باعث مرگ انسان‌ها می‌شود. این باکتری نوعی باسیل هوازی اجباری و اسید فاست است؛ بدین معنی که نه گرم مثبت و نه گرم منفی است و در نتیجه شناسایی آن با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم امکان‌پذیر نیست [۱].

از عمده‌ترین مشکلات تشخیص سل می‌توان به این موارد اشاره کرد: نبود سیستم مدیریتی جامع در آزمایشگاه‌های تشخیص سل، نبود سیستم‌های کنترل کیفی و تضمین کیفیت هنگام انجام آزمایش‌های تشخیص سل، زمان‌بر بودن برخی از این روش‌های تشخیصی مانند کشت آزمایشگاهی خلط و دیگر نمونه‌های حاصل‌شده از بیمار که به ۴ تا ۱۲ هفته وقت نیاز

بیماری سل هنوز به‌عنوان یکی از معضلات بهداشتی ایران و جهان به شمار می‌رود که روزانه هزاران نفر در اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. سل نوعی بیماری عفونی است که در اثر مجموعه مایکوباکتریوم‌های سلی شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم افریکانوم ایجاد می‌شود، اما در بیشتر موارد بیماری ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، یعنی نوع انسانی آن است [۱]. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پاتوژنی درون سلولی است و از طریق هوا منتقل می‌شود. موضع و هدف اصلی این باکتری ریه‌ها، سیستم تنفسی فوقانی و غشای مخاطی آن‌هاست که به عفونت حاد یا مزمن دستگاه تنفسی منجر می‌شود؛ بنابراین، در دفاع علیه این عفونت، پاسخ ایمنی مخاطی و سلولی بسیار اهمیت دارند. به نظر می‌رسد بهترین راه پیشگیری از این

پروتئینی خالص شده از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس القاشده با miRNA را برای تعیین miRNAهای اختصاصی درگیر در پاتوژنز ATB بررسی کردند [۱۰]. Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۳ شش miRNA سرمی را به عنوان بیومارکرهای ترکیبی بالقوه جدید برای تشخیص سل ریوی، غربالگری و شناسایی کردند. یافته‌های این مطالعه نشان داد ترکیب شش miRNA سرمی به عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی سل ریوی به کار گرفته می‌شود [۱۱]. Kim و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند miRNA-125a، فعال‌سازی اتوفازای و پاسخ‌های ضد میکروبی را طی عفونت مایکوباکتریایی مهار می‌کنند. در این مطالعه نشان داده شد ماکروفازهای آلوده با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بیان (miR-125a) miRNA-125a-3p را افزایش می‌دهند که ژن مرتبط با مقاومت به تابش فرابنفش (UVRAG: UV Resistance-Associated Gene) را برای مهار فعال‌سازی اتوفازای و پاسخ‌های ضد میکروبی به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هدف قرار می‌دهد [۱۲]. Lv و همکاران در سال ۲۰۱۶ در چین، میزان بیان miRNA-144 سرمی و خلط را قبل و بعد از درمان بیماران مبتلا به سل بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد میزان بیان miR-144 سرمی و خلط به طور قابل توجهی در بیماران مبتلا، قبل از درمان افزایش می‌یابد، اما بعد از درمان ضد سل به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد [۱۳].

Cui و همکاران در سال ۲۰۱۷ پنل جدیدی از miRNAهای پلازما را شناسایی کردند که عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از افراد سالم تشخیص می‌دهد. در این بررسی miR-769-5p، miR-320a، miR-22-3p و miR-320a به عنوان بیومارکرهای مبتنی بر خون برای TB شناسایی شدند. علاوه بر این، miR-320a ممکن است یک بیومارکر برای TB مقاوم در برابر دارو باشد [۱۴]. Liang و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند miRNA-27b پاسخ التهابی و آپوپتوز را طی عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تنظیم می‌کند. این بررسی نشان داد مسیر سیگنالینگ TLR-2/MyD88/NF-κB به القای بیان miR-27b منجر می‌شود که تولید فاکتورهای پیش‌التهابی و فعالیت NF-κB را سرکوب و از این طریق از التهاب بیش از حد طی عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جلوگیری می‌کند [۱۵]. با وجود پیشرفت‌های پزشکی و تشخیصی مدرن سل در قرن ۲۱، چالش بزرگی برای سلامت عمومی جهانی باقی مانده است. اگرچه تعامل بین مایکوباکتریوم و محیط آن به طور گسترده بررسی شده است، دانش ما در سطح RNA هنوز بسیار محدود است. با وجود اینکه اخیراً مطالعه در زمینه رمزگشایی نقش miRNA در بیماری‌های مایکوباکتریال آغاز شده است، برخی از حقایق انگیزشی و جالب را ارائه داده است که در مطالعات آینده برای شناخت بهتر بیولوژی بیماری و طراحی استراتژی‌های کارآمد کنترل استفاده می‌شود [۱۶].

دارد یا استفاده از روش‌های قدیمی تشخیص بیماری سل مانند استفاده از اسمیر میکروسکوپی به عنوان تنها روش تشخیصی، نداشتن دانش کافی کارکنان آزمایشگاه و همچنین ظهور مایکوباکتریوم‌های غیرسلی به عنوان پاتوژن‌های فرصت طلب که بیماری مشابه با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می‌کنند و در تشخیص با روش‌های مرسوم آزمایشگاهی قابل افتراق با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیستند [۳].

با وجود روش‌های تشخیصی متعدد بیماری سل، سازمان بهداشت جهانی اسمیر میکروسکوپی خلط را به عنوان راه تشخیص اصلی بیماری می‌شناسد؛ بنابراین، سل ریوی غالباً بر اساس مجموعه علائم بالینی، رادیوگرافی قفسه سینه و نتایج اسمیر میکروسکوپی خلط تشخیص داده می‌شود [۳]. حساسیت اسمیر میکروسکوپی خلط با رنگ‌آمیزی زیل نلسون در بررسی‌های گوناگون بین ۲۰ تا ۷۰ درصد متغیر است و وجود حداقل ۱۰<sup>۵</sup> باسیل در هر میلی‌لیتر خلط برای مثبت شدن آن لازم است. برای افزایش این حساسیت باید روش‌ها، افراد و مواد استفاده شده را به سطح باکیفیتی ارتقا داد [۴].

آزمایش پوستی توبرکولین که معمولاً به عنوان مانتوتست شناخته می‌شود، بیشترین آزمایش برای تشخیص سل است. این آزمایش شامل تزریق درون پوستی مشتقات پروتئین خالص شده (PPD: Purified Protein Derivative) است که به تورم محل تزریق منجر می‌شود و در ۷۲ ساعت به حداکثر می‌رسد. PPD حاوی آنتی‌ژن‌های متعددی است که در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر مایکوباکتری‌های غیرسلی موجود است [۵، ۶]. miRNAها مولکول‌های کوچکی هستند که در فرایندهای فیزیولوژیک، پاتولوژیک، رگ‌زایی، آپوپتوز و سرطان نقش مهمی دارند. امروزه از miRNA به عنوان بیومارکرهایی برای تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌ها با هدف جلوگیری از مراحل سخت درمانی در بیماران استفاده می‌شود [۷]. miRNAها عناصر تنظیمی پس از رونویسی هستند که به توالی مکمل روی miRNA هدف متصل می‌شوند و در نتیجه رونویسی سرکوب یا هدف تجزیه شده و ژن خاموش می‌شود.

ژنوم انسانی بیش از ۱۰۰۰ نوع miRNA را کد می‌کند [۸]؛ بنابراین، miRNAها گروهی از RNAهای تنظیمی دارای ۱۹ تا ۲۲ نوکلئوتید هستند که در کنترل بیان ژن در سطح پس از رونویسی دخالت دارند. در نتیجه به عنوان مولکول مداخله گر RNA (RNAi) عمل می‌کنند. miRNA زیرگروه بزرگی از RNAهای غیر کدکننده با ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید و حفاظت شده از نظر تکاملی هستند [۹]. از میان miRNAهای مختلف، miR-147، miR-29a، miR-155، miR-125b، miR-3179a و miR-147 ممکن است نشانگر زیستی بالقوه برای تشخیص سل باشند.

Wu و همکاران در سال ۲۰۱۲ پروفایل بیانی مشتقات

رویی دور ریخته و ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۵ درصد به رسوب اضافه شد. سپس با ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته و اجازه داده شد میکروتیوب خشک شود. در انتها به رسوب ۲۰ میکرولیتر آب DEPC اضافه و ۱۰ دقیقه زمان داده شد تا RNA استخراج شود.

#### ساخت cDNA

این واکنش در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری و با استفاده از مقادیر ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. طبق جدول برای هر نمونه ۴ میکرولیتر cDNA Synthesis Mix، ۱ میکرولیتر آنزیم ریورس ترانس کریپتاز (RTase)، ۸ میکرولیتر RNA و ۷ میکرولیتر PCR grade dH<sub>2</sub>O داخل میکروتیوب ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس برای غیرفعال‌سازی آنزیم RTase ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت.

#### واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۲ انجام شد. این واکنش با یک دناتوراسیون به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد شروع و با آنیلینگ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ادامه پیدا کرد. در نهایت با گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه خاتمه یافت. از ژن U6 به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. برای محاسبه میزان کارایی پرایمرها ابتدا رقت‌های متوالی از cDNA تهیه و پس از انجام ریل‌تایم، منحنی استاندارد رسم و به‌وسیله تخمین شیب خط برای هر نمونه کارایی پرایمرها محاسبه شد. پس از تأیید، آزمون Real time برای همه نمونه‌های سرم (بیمار و شاهد) صورت گرفت.

بررسی بیان miRNA با روش Real time PCR: پس از آنکه از صحت ساخته‌شدن cDNA اطمینان حاصل و در روش PCR معمولی باندهای مدنظر مشاهده شد، این آزمایش برای نمونه‌ها به‌صورت سه بار تکرار با استفاده از پرایمر اختصاصی انجام گرفت. در پایان تکثیر با کمک دستگاه تحلیل منحنی ذوب روی محصول تکثیر انجام پذیرفت تا اختصاصیت و هویت محصول اصلی تکثیر یافته تأیید شود. برای این تحلیل، دمای پلیت به‌آرامی از ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد افزایش داده

مطالعه حاضر تلاش شد پروفایل بیان miRNAها در مراحل مختلف عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شود.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مورد شاهدهی بود و نتایج حاصل بین دو گروه بیمار و سالم مقایسه شد. معیارهای ورود به مطالعه شامل رضایت بیمار، افراد PPD مثبت و اسمیر مثبت، افراد PPD مثبت و اسمیر مثبت و افراد PPD منفی و اسمیر منفی دارای علائم بود. معیارهای خروج افراد در مطالعه حاضر شامل نارضایتی بیمار، ابتلا به بیماری‌های دیابت، هیپاتیت B، بیماری‌های نقص ایمنی و هرگونه بیماری درگیرکننده سیستم ایمنی بود. افراد شاهد بیماری‌های زمینه‌ای مانند دیابت نداشتند و سیستم ایمنی سالم داشتند. نمونه‌های خون با هماهنگی پزشک متخصص از بیمارستان‌های شهید دادبین و افضل‌پور شهر کرمان جمع‌آوری شدند. ۲۰۰ نمونه در چهار گروه از خون افراد مشکوک به عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس طی ۳ سال و همین تعداد نمونه از افراد بدون علائم به‌عنوان گروه کنترل نیز تهیه شد. نمونه‌ها با توجه به افراد، به چهار گروه تقسیم شدند: افراد PPD مثبت و اسمیر منفی، افراد اسمیر مثبت و PPD منفی، افراد PPD مثبت و اسمیر مثبت و در نهایت افرادی که علائم بیماری را داشتند، اما PPD منفی و اسمیر منفی بودند.

خون‌های لخته‌شده گرفته‌شده ابتدا با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ و سرم خون جداسازی شد. سرم تا انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج RNA با استفاده از کیت سیناژن انجام گرفت [۱۶]. ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول RNx-PLUS به نمونه مدنظر داخل میکروتیوب اضافه شد (۵۰۰ میکرولیتر سرم). سپس ۵ تا ۱۰ ثانیه به‌آرامی تکان داده شد و ۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شد. پس از آن به مدت ۵ دقیقه داخل یخ قرار گرفت و با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و فاز رویی به داخل میکروتیوب جدید انتقال داده شد. در مرحله بعد هم حجم فاز رویی ایزوپروپانول اضافه و یک شبانه‌روز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در این مرحله رسوب دیده، محلول

جدول ۱: مواد مورد نیاز ساخت cDNA

Reagent	20 µl reaction	Final concentration
cDNA Synthesis Mix (oligo(dt), random hexamers, mgcl2, dNTP, Buffer)	4 µl	1x
RTase	1 µl	
Total RNA	8 µl	
PCR grade dH <sub>2</sub> O	Up to 20 µl final volume	

جدول ۲: توالی پرایمرهای استفاده شده

منبع	توالی	ژن
[۱۷]	F: 5'-CGGCGGTAGCTTATCAGACTGATGT-3'	miR-21
	R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	
	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'	U6
	R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	

در این مطالعه به منظور تأیید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از نبود محصول غیراختصاصی، دایمر پرایمر و آلودگی از تحلیل منحنی ذوب استفاده شد. پس از اتمام فرایند تکثیر، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص به مقادیر معینی تغییر می‌دهد و در این مدت سیگنال فلورسانت ساطع شده از نمونه با دستگاه اندازه‌گیری می‌شود. هم‌زمان با این عمل نمودار تغییرات فلورسانت برحسب دما ترسیم می‌شود که همان نمودار ذوب است. با مشتق‌گیری از این نمودار، منحنی درجه دومی به دست می‌آید که در این منحنی هر پیک نمایانگر یک محصول تکثیر یافته است. در تحلیل منحنی ذوب به واسطه تغییرات دمایی که پس از اتمام فرایند PCR صورت می‌پذیرد، هر قطعه DNA دو رشته‌ای موجود در محصول بر اساس طول و محتوای بازهای GC در دمای ذوب اختصاصی خود، تک‌رشته‌ای می‌شود و این تغییر حالت با سیستم به صورت پیک نمایش داده می‌شود. بدیهی است پیک‌هایی که در دمای کمتری قرار دارند، نشان‌دهنده قطعات کوچک‌تر هستند. با بررسی پیک‌های به وجود آمده می‌توان به این حقیقت پی برد که پیک‌های تشکیل شده در دمای کم ارتباط مستقیمی با مقدار محصولات غیراختصاصی تشکیل شده در انتهای فرایند PCR دارند. همان‌گونه که در شکل ۲ و ۳ ملاحظه می‌شود، وجود تنها یک پیک برای هر ژن در دمای ذوب ویژه آن، نشان‌دهنده اختصاصی بودن محصول تکثیر است. از آنجایی که هر ژن منحنی ذوب خاص خود را دارد، بنابراین، منحنی‌های یک ژن در تمام نمونه‌ها باید بر هم منطبق و تمام منحنی‌ها تک‌قله باشند. بر این اساس از نبود مواردی چون تکثیر غیراختصاصی، دایمر پرایمر و آلودگی اطمینان حاصل شد.

شد و طی آن سیگنال فلورسانس محصول تکثیر یافته به‌طور پیوسته با دستگاه خوانده شد. سپس دستگاه منحنی یا نمودار شدت فلورسانس در مقابل دما ترسیم شد. با ارزیابی پیک اختصاصی و انحصاری محصول تحت مطالعه یعنی miRNA-21 و نیز پیک دایمر پرایمر از اختصاصیت تکثیر Real-Time PCR اطمینان حاصل شد.

### تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و محاسبه بیان هر miRNA از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

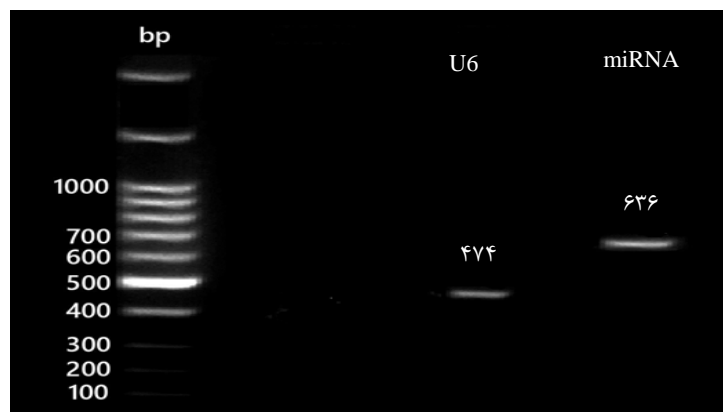
### یافته‌ها

#### بررسی صحت ساخت cDNA

نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات واکنش PCR برای بررسی صحت ساخت cDNA در شکل ۱ نشان داده شده است.

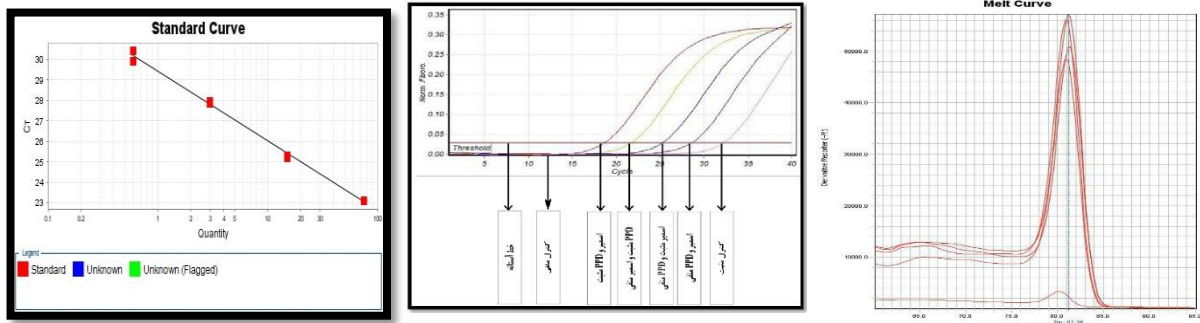
#### بررسی بیان miRNA با روش Real time PCR

نمودار منحنی تکثیر ژن U6 به‌عنوان ژن کنترل داخلی و miR-21 با اندازه‌گیری تغییرات میزان فلورسانس رسم شد. در شکل ۲ و ۳ نتایج حاصل از تکثیر cDNA پس از انجام آزمایش RT-PCR آورده شده است. با توجه به شکل‌های یادشده، در منحنی تکثیر miR-21 و هم در منحنی تکثیر U6 کنترل مثبت و هم کنترل منفی نشان داده شده است و نتایج با توجه به کنترل مثبت و منفی Ct‌های روی منحنی تکثیر تأیید شدند.

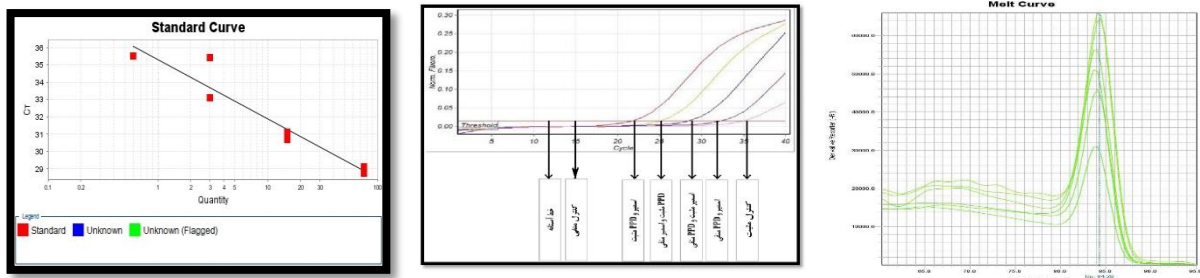


شکل ۱: نتیجه Conventional PCR با پرایمرهای اختصاصی miRNA و U6

(ستون ۱: محصول PCR مربوط به miR-21 (۶۳۶bp)، ستون ۲: محصول PCR مربوط به U6 (۴۷۴bp)، ستون ۳: مارکر (۱۰۰bp).



شکل ۲: از چپ به راست به ترتیب منحنی استاندارد پرایمرهای ژن miR-21، منحنی تکثیر miRNA-21 و منحنی ذوب miRNA-21

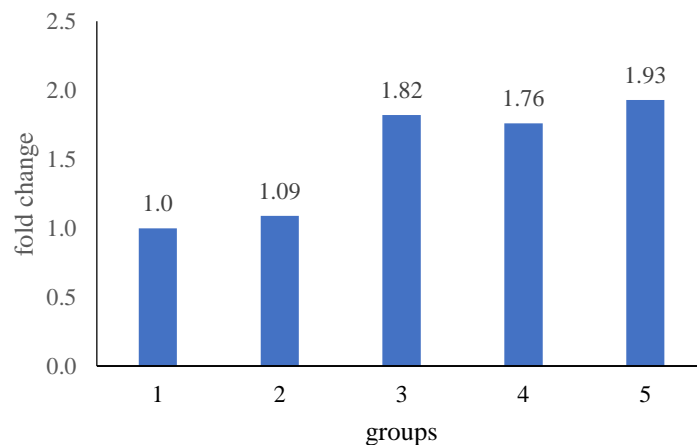


شکل ۳: از چپ به راست به ترتیب منحنی استاندارد پرایمرهای ژن U6، منحنی تکثیر U6 و منحنی ذوب U6

شاهد بود. در افراد اسمیر مثبت و PPD مثبت نیز مقدار بیان miR-21 به‌طور معناداری افزایش یافته بود ( $P < 0.05$ ). میزان بیان ژن در افراد اسمیر مثبت و PPD مثبت ۱/۹۳ برابر افراد شاهد محاسبه شد.

برخلاف سایر گروه‌های بررسی‌شده، بیان miR-21 در افراد اسمیر منفی و PPD منفی تفاوت معناداری با افراد شاهد نداشت ( $P > 0.05$ ) و مقدار آن نسبت به گروه شاهد تنها ۱/۰۹ برابر افزایش یافته بود. به‌منظور مقایسه بهتر گروه‌های مطالعه‌شده (اسمیر مثبت، PPD منفی، اسمیر مثبت و PPD مثبت، اسمیر منفی و PPD منفی) با گروه شاهد نتایج مربوط به بیان miR-21 در شکل ۴ نشان داده شده است.

در این مطالعه تفاوت معنی‌داری در بیان سرمی ژن miR-21 در افراد اسمیر منفی و PPD منفی دارای علامت وجود نداشت، اما در افراد اسمیر مثبت، PPD منفی و افراد اسمیر مثبت و PPD مثبت افزایش معنی‌داری در بیان ژن miR-21 وجود داشت ( $P < 0.05$ ). در افراد اسمیر مثبت و PPD منفی میزان بیان miR-21 افزایش معناداری نسبت به افراد شاهد داشت ( $P < 0.05$ ). با توجه به اینکه مقدار بیان در افراد شاهد ۱ در نظر گرفته شده بود، بیان miR-21 در افراد اسمیر مثبت ۱/۷۶ برابر افراد شاهد شد. در افراد PPD مثبت و اسمیر منفی نیز بیان miR-21 افزایش معناداری را نسبت به افراد شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ) که مقدار آن ۱/۸۲ برابر افراد



شکل ۴: مقایسه بیان miR-21 در چهار گروه مطالعه‌شده در مقایسه با افراد شاهد

(۱: کنترل؛ ۲: miR-21 در گروه اسمیر منفی و PPD منفی؛ ۳: miR-21 در گروه PPD مثبت و اسمیر منفی؛ ۴: miR-21 در گروه اسمیر مثبت و PPD مثبت؛ ۵: miR-21 در گروه اسمیر مثبت و PPD مثبت)

و PPD مثبت بود.

در مطالعه Drury و همکاران [۲۱] از میان ۳۰ بیومارکر بیماری‌های عفونی که از روش پروفایلینگ miRNA استفاده کرده بودند، شایع‌ترین miRNAهای بیومارکر شناسایی شده شامل miR-146، miR-21، miR-29، miR-122، miR-194، miR-134، miR-125، miR-22، miR-16، miR-150 و miR-106 بودند. همچنین این miRNA با کنترل سیستم ایمنی در برابر پاتوژن‌های باکتریایی در ارتباط است. در واقع، بیان بیش از حد miR-21 نه تنها در بافت‌های سرطانی معده، بلکه در موکوس معده غیرسرطانی و سلول‌های اپیتلیال معده آلوده به هلیکوباکتر پیلوری نیز مشاهده شده است [۲۲]. Wu و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بررسی نقش miR-21 در پاسخ‌های ضد مایکوباکتریایی مشخص کردند این miRNA می‌تواند IL-12 و Bcl-2 را هدف قرار دهد. عفونت سل می‌تواند بیان miR-21 را احتمالاً از طریق مسیر NF-κB/TLR/Erk القا کند [۲۳].

Abd-El-Fattah و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود اعلام کردند بیان متفاوت miRNAها در سرم بیماران مصری مبتلابه سل ریوی بررسی شده است. نتایج آنان نشان داد تنها سطح سرمی miR-197 در بیماران مبتلابه سل در مقایسه با افراد سالم به‌طور معنی‌داری بیشتر بود [۲۴]. Zhou و همکاران miRNAهای گردشی را به‌عنوان بیومارکرهای سریع تشخیصی در عفونت توبرکلوزیس در کودکان معرفی کردند. در تحقیق آنان miRNAهای miR-10a، miR-1، miR-155، miR-29، miR-31، miR-146a و miR-125b به ترتیب بیشترین بیان را در افراد آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشتند [۲۵]. Wang و همکاران پیشنهاد کردند بیان miR-144 در بیماران آلوده به توبرکلوزیس افزایش می‌یابد [۲۶]. Kleinsteuber و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود میزان بیان miRNAهای مختلف را در افراد آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی کردند. در این مطالعه مشخص شد بیان miRNAهای miR-26a، miR-29a و miR-142-3p کاهش و میزان بیان miRNA-21 افزایش یافته است [۲۷]. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌تواند بیانگر افزایش بیان miRNA در سلول‌های افراد آلوده باشد که به دنبال تحریک آنتی‌ژنی ناشی از حضور مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

در مطالعات پیشین افزایش میزان بیان miRNAهای ۲۱، ۳۱، ۱۴۶، ۱۵۵ در افراد آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس گزارش شده بود. از سوی دیگر مشخص شده است بیان miRNA در سلول‌های لنفوسیت T در زمان‌های بروز بیماری افزایش می‌یابد که به تشدید پاسخ‌های ایمنی و التهابی منجر می‌شود. همین شاخص می‌تواند به شناسایی بهتر بیماری کمک شایانی کند. با توجه به نقش تنظیمی و کنترلی miRNAها در

بیماری سل که باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل آن است، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی است که جوامع بشری با آن درگیر بوده‌اند. در قرن ۱۷ و ۱۸ میلادی در اروپا سل علت یک‌چهارم از مرگ‌ومیرها مطرح شد و در دوران صنعتی شدن اروپا نام طاعون سفید بر آن نهادند [۱۸]. در کنار بهره‌گیری از روش‌های مولکولی، تحقیقات ایمنی‌شناسی و شناسایی پاسخ‌هایی که سلول‌های دستگاه ایمنی در برابر این بیماری از خود نشان می‌دهند، سائتوکاین‌ها و تغییرات بیان ژن‌های درگیر می‌تواند در شناسایی مولکول‌ها در درمان این بیماری مؤثر باشد. شناسایی عوامل کنترل‌کننده این پاسخ‌های ایمنی نیز می‌تواند در شناسایی بیماری کمک شایانی کند. از جمله این مکانیسم‌ها که ظاهراً در کنترل پاسخ‌های ایمنی نقش مهمی ایفا می‌کنند، مولکول‌های کوچک RNA غیر قابل ترجمه، یعنی مولکول‌های miRNA هستند [۲۰، ۱۹]. آنچه مهم است توجه به نقش تنظیمی و کنترلی miRNAها در بدن و تأثیر مهم آن‌ها در تکامل و شکل‌گیری سلول‌های ایمنی و همچنین پاسخ‌دهی آن‌ها به عوامل بیماری‌زاست که ظاهراً مایکوباکتریوم‌ها این توانایی را دارند که بیان این عوامل تنظیمی را تغییر دهند و بدین ترتیب شرایط را برای بقا و ماندگاری خود بهینه کنند.

با توجه به پیشینه و مطالعات انجام‌شده، با بررسی نقش miR-21 در پاسخ‌های ضد مایکوباکتریایی مشخص شده بود که miR-21 می‌تواند IL-12 و Bcl-2 را هدف قرار دهد و عفونت سل می‌تواند بیان miR-21 را احتمالاً از طریق مسیر NF-κB/TLR/Erk القا کند. همچنین در مطالعه Drury و همکاران (۲۰۱۷) از میان ۳۰ بیومارکر بیماری‌های عفونی که از روش پروفایلینگ miRNA استفاده کرده بودند، شایع‌ترین miRNAهای بیومارکر شناسایی شده در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل miR-146، miR-21، miR-29، miR-122، miR-150، miR-16، miR-22، miR-125، miR-134، miR-194 و miR-106 بودند و نشان داده شد miR-21 به‌طور گسترده‌ای نسبت به بقیه miRNA در عفونت‌های باکتریایی بیان می‌شود [۲۱].

هدف کلی مطالعه حاضر بررسی میزان بیان سرمی miR-21 در بیماران مشکوک به عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود. در این مطالعه بیان miR-21 برای اولین بار در گروه‌های مجزای اسمیر مثبت و PPD منفی، PPD مثبت و اسمیر منفی، اسمیر مثبت و PPD مثبت و افراد دارای علامت اسمیر منفی و PPD منفی و نیز افراد شاهد قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد شاخص miR-21 تنها در افراد دارای علائم اسمیر منفی و PPD منفی تفاوت معناداری نسبت به گروه شاهد نداشت. نتایج حاصل نشان‌دهنده افزایش بیان miR-21 در نمونه‌های اسمیر مثبت و PPD منفی، PPD مثبت و اسمیر منفی، اسمیر مثبت

## تشکر و قدردانی

این مقاله از بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری تخصصی میکروبیولوژی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان گرفته شده است. بدین‌وسیله نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی پاسارگاد تهران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان به دلیل همکاری صمیمانه ایشان تقدیر و تشکر می‌کنند.

## تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی بین نویسندگان و نتایج مطالعه وجود ندارد.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان با شناسه IR.KMU.REC.1398.384 تأییدیه دارد.

## سهم نویسندگان

نویسنده اول (پژوهشگر اصلی): نوشتن پروپوزال، جمع‌آوری نمونه‌ها و داده‌ها، انجام آزمایش‌ها و مشارکت در نگارش مقاله (۴۰ درصد)؛ نویسنده دوم (پژوهشگر اصلی): مسئول مکاتبات، طراحی پروژه، تفسیر داده‌ها، نگارش و ویرایش مقاله (۳۰ درصد)؛ نویسنده سوم و چهارم: (پژوهشگر همکار): تفسیر و تحلیل داده‌ها هر کدام (۱۵ درصد).

## حمایت مالی

پژوهش حاضر از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد کرمان پشتیبانی مالی شده است.

کنترل و شکل‌گیری پاسخ ایمنی و مواجهه با عوامل بیماری‌زا، بررسی دقیق‌تر این عامل در مقابله با بیماری‌های همه‌گیری نظیر بیماری توبرکلوزیس در بدن و تأثیر مهم آن‌ها در تکامل و شکل‌گیری سلول‌های ایمنی و همچنین پاسخ‌دهی آن‌ها به عوامل بیماری‌زا اهمیت بسزایی دارد. بر اساس مطالب ذکر شده، miR-21 علاوه بر بیومارکر تشخیصی، می‌تواند در تشخیص و درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شود.

## نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر سطح بیان miR-21 در افراد آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس افزایش یافته بود. در افراد اسمیر مثبت، PPD منفی و نیز در افرادی که هم اسمیر مثبت و هم PPD مثبت بودند، بیان miR-21 افزایش معناداری را نشان داد. در افراد دارای علامت اسمیر منفی و PPD منفی نیز بیان miR-21 افزایش یافته بود، اما این افزایش معنادار نبود که نشان‌دهنده دقت کم آزمایش‌های میکروسکوپی و پوستی در تشخیص عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. برخی از این افراد احتمالاً به عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده بودند، اما تست اسمیر و PPD قادر به تشخیص آن‌ها نبود. در واقع نتایج تست آن‌ها کاذب بوده است. با توجه به ارتباط میان miR-21 و این عفونت، می‌توان از مهارکننده‌های miR-21 در درمان بیماری نیز استفاده کرد. جزئیات بیشتر و نزدیک شدن این miRNA به کاربردهای بالینی نیازمند تحقیقات بیشتر است که امید می‌رود در آینده سایر پژوهشگران انجام دهند و از توانایی بالقوه miR-21 در تشخیص و درمان عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شود. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که miR-21 می‌تواند به‌عنوان نوعی مارکر مناسب برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شود.

## REFERENCES

- Nikolayevskiy V, Kranzer K, Niemann S, Drobniewski F. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: a systematic review. *Tuberculosis*. 2016;98:77-85. PMID: 27156621 DOI: 10.1016/j.tube.2016.02.009
- Namvarpour M, Mansouri R, Tebianian M. Evaluation of three different administration routes (IM, SC and IN) on humoral immune responses against *Mycobacterium Tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 fusion protein. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*. 2018;25(7):537-46. [Persian]
- Azadi D, Shojaei H. The role of the laboratory in the diagnosis of tuberculosis. *Iran J Med Microbiol*. 2016; 10(2):1-15.
- Raviglione MC, Uplekar MW. WHO's new stop TB strategy? *Lancet*. 2006;367(9514):952-5. PMID: 16546550 DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68392-X
- Jafari M, Mansori R. A review of methods for immunological diagnosis of tuberculosis infection. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*. 2018;24(10):852-60. [Persian]
- Kiazyk S, Ball T. Latent tuberculosis infection: an overview. *Can Commun Dis Rep*. 2017;43(3-4):62-6. PMID: 29770066 DOI: 10.14745/ccdr.v43i34a01
- Keck J, Gupta R, Christenson LK, Arulanandam BP. microRNA mediated regulation of immunity against gram-negative bacteria. *Int Rev Immunol*. 2017;36(5):287-99. PMID: 28800263 DOI: 10.1080/08830185.2017.1347649
- Maltby S, Plank M, Tay HL, Collison A, Foster PS. Targeting microRNA function in respiratory diseases: mini-review. *Front Physiol*. 2016;7:21. PMID: 26869937 DOI: 10.3389/fphys.2016.00021
- Mao S. microRNA processing (phase) separated. *Science*. 2017;357(6357):1251-2. DOI: 10.1126/science.357.6357.1251-f
- Wu J, Lu C, Diao N, Zhang S, Wang S, Wang F, et al. Analysis of microRNA expression profiling identifies miR-155 and miR-155\* as potential diagnostic markers for active tuberculosis: a preliminary study. *Hum Immunol*. 2012; 73(1):31-7. PMID: 22037148 DOI: 10.1016/j.humimm.2011.10.003
- Zhang X, Guo J, Fan S, Li Y, Wei L, Yang X, et al. Screening and identification of six serum microRNAs as novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis. *PLoS One*. 2013;8(12):e81076. PMID: 24349033 DOI: 10.1371/journal.pone.0081076
- Kim JK, Yuk JM, Kim SY, Kim TS, Jin HS, Yang CS, et al. MicroRNA-125a inhibits autophagy activation and antimicrobial responses during mycobacterial infection. *J Immunol*. 2015;194(11):5355-65. PMID: 25917095 DOI: 10.4049/jimmunol.1402557
- Lv Y, Guo S, Li XG, Chi JY, Qu YQ, Zhong HL. Sputum and serum microRNA-144 levels in patients with tuberculosis before and after treatment. *Int J Infect Dis*. 2016;43:68-73. PMID: 26724775 DOI: 10.1016/j.ijid.2015.12.014



14. Cui JY, Liang HW, Pan XL, Li D, Jiao N, Liu YH, et al. Characterization of a novel panel of plasma microRNAs that discriminates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and healthy individuals. *PLoS One*. 2017;**12**(9):e0184113. PMID: 28910318 DOI: 10.1371/journal.pone.0184113
15. Liang S, Song Z, Wu Y, Gao Y, Gao M, Liu F, et al. microRNA-27b modulates inflammatory response and apoptosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2018;**200**(10):3506-18. PMID: 29661829 DOI: 10.4049/jimmunol.1701448
16. Hatefi N, Nouraei N, Parvin M, Ziaee SA, Mowla SJ. Evaluating the expression of oct4 as a prognostic tumor marker in bladder cancer. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;**15**(6):1154-61. PMID: 23653844
17. Wu Y, Song Y, Xiong Y, Wang X, Xu K, Han B, et al. MicroRNA-21 (Mir-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN in colorectal cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;**43**(3):945-58. PMID: 28957811 DOI: 10.1159/000481648
18. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001;**1**(1):20-30. PMID: 11905811 DOI: 10.1038/35095558
19. Fu Y, Yi Z, Wu X, Li J, Xu F. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2011;**49**(12):4246-51. PMID: 21998423 DOI: 10.1128/JCM.05459-11
20. Singh PK, Singh AV, Chauhan DS. Current understanding on micro RNAs and its regulation in response to Mycobacterial infections. *J Biomed Sci*. 2013;**20**(1):14. PMID: 23448104 DOI: 10.1186/1423-0127-20-14
21. Drury RE, O'Connor D, Pollard AJ. The clinical application of microRNAs in infectious disease. *Front Immunol*. 2017;**8**:1182. PMID: 28993774 DOI: 10.3389/fimmu.2017.01182
22. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol*. 2011;**8**(5):706-13. PMID: 21712654 DOI: 10.4161/ra.8.5.16154
23. Wu Z, Lu H, Sheng J, Li L. Inductive microRNA-21 impairs anti-mycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. *FEBS Lett*. 2012;**586**(16):2459-67. PMID: 22710123 DOI: 10.1016/j.febslet.2012.06.004
24. Abd-El-Fattah AA, Sadik NA, Shaker OG, Aboulftouh ML. Differential microRNAs expression in serum of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, and pneumonia. *Cell Biochem Biophys*. 2013;**67**(3):875-84. PMID: 23559272 DOI: 10.1007/s12013-013-9575-y
25. Zhou M, Yu G, Yang X, Zhu C, Zhang Z, Zhan X. Circulating microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Mol Med Rep*. 2016;**13**(6):4620-6. PMID: 27082104 DOI: 10.3892/mmr.2016.5097
26. Wang C, Yang S, Sun G, Tang X, Lu S, Neyrolles O, et al. Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis. *PLoS One*. 2011;**6**(10):e25832. PMID: 22003408 DOI: 10.1371/journal.pone.0025832
27. Kleinstaub K, Heesch K, Schattling S, Kohns M, Sander-Jülch C, Walzl G, et al. Decreased expression of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in CD4<sup>+</sup> T cells and peripheral blood from tuberculosis patients. *PLoS One*. 2013;**8**(4):e61609. PMID: 23613882 DOI: 10.1371/journal.pone.0061609