



بررسی اثر میکرو RNAهای ویروس BK و سلول میزبان در بیماران پیوند کلیه

راضیه سپهی^{۱*} (MSc)، عیسی جرجانی^۱ (PhD)، افسون افشاری^{۲**} (PhD)، حسین صبوری^۳ (PhD)، رامین یعقوبی^۴ (PhD)

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

^۲ مرکز تحقیقات نفرو-اورولوژی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۳ گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، ایران

^۴ مرکز تحقیقات پیوند شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱۲ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶)

چکیده

زمینه: پولیوما ویروس BK یکی از عفونت‌های خطرناک در بیماران دریافت کننده کلیه پیوندی است. فعال شدن این ویروس می‌تواند در نهایت منجر به از دست دادن پیوند شود. مطالعات بر روی میزان بیان میکرو RNAهای ویروس BK بسیار کم است. بنابراین در این مطالعه به بررسی عملکرد میکرو RNAهای ویروس BK و تأثیر آن‌ها بر میزان بیان میکرو RNAهای سلول میزبان پرداختیم. ویروس BK دو میکرو RNA، miR-B1-3p و miR-B1-5p را کد می‌کند. بنابراین مطالعه این میکرو RNAها به عنوان نشانگرهای عفونت ویروسی و تنظیم آن‌ها ضروری می‌باشد زیرا تاکنون هیچ دارو تأیید شده یا واکنشی برای درمان عفونت ویروس BK وجود ندارد. از این رو شناخت ارتباط بین میکرو RNAهای ویروس BK و سلول میزبان برای کنترل عفونت در بیماران پیوند کلیه شده امری حیاتی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۰ نمونه بافتی از گیرندگان پیوند کلیه با علائم نفروپاتی ویروس BK، ۱۰ نمونه ادرار از بیماران پیوند کلیه شده بدون عفونت فعال ویروس BK و ۲۰ فرد سالم را انتخاب کردیم. سطح بیان میکرو RNAهای مورد مطالعه در همه افراد منتخب در تحقیق با استفاده از روش SYBR Green Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به این صورت بود که سطح بیان میکرو RNAهای مورد مطالعه از جمله miR-30a، miR-10b، miR-155، miR-520 و miR-B1-3p و miR-B1-5p در نمونه‌های بافتی از افراد پیوند کلیه شده با علائم نفروپاتی ویروس BK به طور قابل توجهی بالاتر از بیماران پیوند کلیه شده بدون عفونت فعال ویروس BK بود.

نتیجه‌گیری: بنابراین به نظر می‌رسد، برخی از میکرو RNAها از جمله miR-30a، miR-520 و miR-B1-3p/5p می‌تواند به عنوان گزینه‌های پیشنهادی در پیش‌بینی و پیشگیری از فعال‌سازی BKPyV در KTRها و به ویژه در نمونه‌های ادرار مطرح باشند.

واژگان کلیدی: پیوند کلیه، ویروس BK، میکرو RNA، نفروپاتی، miR-B1-3p، miR-B1-5p

* شیراز، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

مقدمه

کلیه‌ها از اعضای مهم بدن هستند که وظیفه آن‌ها حذف مواد زائد از بدن و تصفیه خون می‌باشد. کلیه‌ها در هر ۲۴ ساعت حدود ۲-۳ لیتر ادرار را تولید می‌کنند. وقتی کارکرد کلیه‌ها به کمتر از ۱۰ درصد حد طبیعی برسد فرد دچار نارسایی کلیوی می‌شود و به سمت دیالیز سوق داده می‌شود، در صورتی که دیالیز جوابگوی بیماری نباشد به بیمار پیوند کلیه پیشنهاد می‌شود. عوامل زیادی در رد پیوند کلیه دخیل هستند از جمله عوامل بسیار مهم رد پیوند کلیه عوامل ویروسی هستند (۱).

یکی از مهم‌ترین ویروس‌هایی که می‌تواند پیوند کلیه را به شدت تهدید کند ویروس BK می‌باشد (۲).

ویروس BK یک ویروس DNAی دو رشته‌ای کوچک بدون پوشش و با کپسید چند وجهی و متعلق به خانواده Polyomaviridae می‌باشد که در حدود ۸۰ درصد از جمعیت حاوی نوعی پنهان از این ویروس است که تا زمانی که بدن تحت نوعی سرکوب سیستم ایمنی قرار نگیرد، نهفته می‌ماند (۳). از ۱۰-۱ درصد بیماران پیوند کلیه به نفروپاتی مرتبط با BKPyV (BKPYVAN) پیشرفت می‌کنند و تا ۸۰ درصد این بیماران پیوند خود را از دست می‌دهند. شروع نفريت می‌تواند در اوایل چند روز پس از پیوند تا اواخر ۵ سال اتفاق بیفتد (۴).

برخی داروها، بیماری‌ها و اختلالات ژنتیکی منجر به نارسایی کلیه می‌شود. دیابت و فشار خون شایع‌ترین علل نارسایی و از دست دادن کلیه در کشور است. حدود ۱۰ میلیون ایرانی به نارسایی کلیه مبتلا هستند. از این ۱۰ میلیون نفر مبتلا به نارسایی کلیه که بیماری آن‌ها بین خفیف تا شدید طبقه‌بندی می‌شود در نارسایی حاد کلیه حدود ۵۰ تا ۶۰ هزار نفر در کشور وجود دارند که حدود ۲۷ هزار نفر دیالیزی و ۲۵ هزار نفر پیوند کلیه شده‌اند (۵). میکرو RNA ها RNA غیر کد کننده تک

رشته‌ای (حدود ۲۲ نوکلئوتید) است که در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها یافت می‌شود (۶). میکرو RNA ها در خاموش کردن RNA و تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی نقش دارند. رونوشت اولیه میکرو RNA ها بوسیله آنزیم دروشا به میکرو RNA پیش‌ساز تبدیل می‌شود، سپس توسط ناقلی به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند و بعد از عمل کردن آنزیم دایسر، میکرو RNA بالغ تولید می‌شود (۷). ویروس BK دو میکرو RNA بالغ تولید می‌کند miR-B1-3p و miR-B1-5p (۸).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که میکرو RNA های BKPyV تکثیر ویروس را کنترل کرده و به آن کمک میکنند از سیستم ایمنی میزبان فرار کند و تکثیر ویروس را با کاهش بیان سلول‌های T تنظیم می‌کند. miR-B1-3p با جلوگیری از تشخیص سلول‌های آلوده به ویروس توسط سیستم ایمنی میزبان، نقش مهمی در فرار ویروس از سیستم ایمنی دارد (۹). اما مطالعات انجام شده در مورد بیان microRNA BKPyV در افراد پیوند کلیه شده بسیار کم است. در این تحقیق با توجه به اهمیت عفونت ویروس BK در پیوند کلیه و نبودن درمان قطعی برای آن به بررسی اثر میکرو RNA های ویروس BK بر برخی از میکرو RNA های منتخب و با اهمیت سلول میزبان پرداخته شد. همچنین میزان بیان برخی از میکرو RNA های مهم در عفونت‌های کلیه از قبیل miR-30a, miR-10b, miR-155, miR-520 نیز بررسی شد و با میزان بیان microRNA BKPyV در بیماران پیوند کلیه شده مقایسه شد. بعد از عفونت ویروس BK میکرو RNA های این ویروس در سلول میزبان افزایش می‌یابد (۱۰). به دنبال عفونت، برخی از میکرو RNA های سلول میزبان نیز افزایش پیدا می‌کنند

(۱۱). بنابراین بیان این میکرو RNAها در این پروژه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

افراد مورد مطالعه

برای انجام این طرح تمام نمونه‌های بیماران پیوند کلیه با عفونت فعال ویروس BK که به بیمارستان ابوعلی سینا شهر شیراز مراجعه کرده بودند جمع‌آوری شد و از بین آن‌ها نمونه بیمارانی که مبتلا به نفروپاتی شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. لذا ما در این بازه زمانی با محدودیت تعداد نمونه مواجه بودیم و تمام نمونه‌های ممکن را مورد ارزیابی قرار دادیم.

در این مطالعه مقطعی از بیماران دریافت کننده پیوند کلیه که از سال ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۲ در بیمارستان ابوعلی سینا شیراز بستری بودند استفاده شد. ۱۰ نمونه بافت از بیماران دریافت کننده پیوند کلیه با علائم نفروپاتی مرتبط با ویروس BK، ۱۰ نمونه ادرار از بیماران دریافت کننده پیوند کلیه بدون عفونت فعال ویروس BK، ۲۰ نمونه ادرار از افراد سالم به عنوان گروه کنترل جمع‌آوری شد. رده سنی افراد حاضر در این مطالعه ۶۰-۱۸ سال بود و گیرندگان پیوند کلیه حداقل شش ماه قبل پیوند را انجام داده بودند. افراد بعد از عمل پیوند کلیه بدون عفونت فعال ویروسی EBV و CMV و همچنین بدون علائم هپاتیت B و C بودند.

از جمعیت مورد مطالعه ۵۰ میلی‌لیتر نمونه ادرار و نمونه بیوپسی پارافینه با رضایت افراد گرفته شد. اصول ایمنی مربوط به نمونه‌گیری در محیط آزمایشگاه به دقت رعایت شد و تمام نمونه‌ها با استفاده از برچسب مخصوص کدگذاری شد و اطلاعات در فایل‌های کامپیوتری با رعایت اصول حفظ اطلاعات و مشخصات بیماران ذخیره شد (مجوز اخلاق: ۶۱۱. ۱۴۰۰. IR.SUMS.REC).

استخراج سلول از نمونه بافت

برای پارافین‌زدایی از نمونه‌های بافت ابتدا یک برش ۱۵-۱۰ میکرومتری از نمونه بافت درون میکروتیوپ استریل گذاشته شد و به آن ۱ میلی‌لیتر زایلن اضافه و مدت زمان ۵ ثانیه ورتکس و ۳۰ دقیقه شیک دادن با شیکر به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژ (Hettich Universal-Germany) شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، محتویات میکروتیوپ را خالی و سپس اضافه کردن زایلن، ورتکس، و سانتریفیوژ سه بار تکرار شد. در ادامه در دو مرحله ۱ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد به میکروتیوپ اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی حذف و ۳۰ میکرولیتر استون به میکروتیوپ اضافه شد. بعد از اتمام پارافین‌زدایی ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتیناز K و ۱۰۰ میکرولیتر بافر آنزیم پروتیناز K اضافه و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به میکروتیوپ ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K اضافه و ۳ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰-۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

استخراج سلول از نمونه ادرار

در این مرحله نمونه به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. لایه رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شد. سپس رسوب در ۱ میلی‌لیتر PBS حل شد و در ۸۰- ذخیره شد.

استخراج RNA

به ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه، ۷۵۰ میکرولیتر محلول تریزول اضافه شد، و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد اضافه شد. نمونه با دور rpm ۱۳۵۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۱۰۰۰

(Eurox, UK) با استفاده از ترموسایکلر (Germany, Eppendorf) سنتز شد.

ارزیابی میزان بیان miRNA

در این پژوهش روش سنتز cDNA شامل stem loop بود که برای این روش پرایمر forward توالی میکرو RNA بود و پرایمر Reverse شامل بخشی از توالی stem loop طراحی شده بود. تعیین کمیت سطح بیان miRNA های مورد مطالعه از طریق Syber green Real-time PCR، و به کمک U6 به عنوان یک کنترل داخلی انجام شد. طراحی پرایمرهای miR-30a، miR-10b، miR-155، miR-520 با روش stem loop انجام شد. سپس واکنش های Real-time PCR با استفاده از کیت Eurox، انگلستان به حجم ۲۰ میکرولیتر بهینه سازی شد و با دستگاه Applied Biosystems Step One (ABI Step One PlusTM) بیان ژن بررسی شد.

میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد سرد به لایه رویی اضافه شد. به مدت یک شب در دمای ۲۰- نگهداری شد. سپس میکروتیوپ در دور rpm ۱۳۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه شد و با دور rpm ۸۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب نهایی در ۲۵ میکرولیتر آب DEPC حل و به مدت ۱۰ دقیقه در Dry Block (Techne, UK) قرار داده شد. کمیت و کیفیت RNA ها با کمک نانودراپ (USA, Thermofisher) ارزیابی شد.

سنتز cDNA

پس از استخراج RNA، cDNA برای هر نمونه با استفاده از دستورالعمل کیت سنتز cDNA

جدول ۱) توالی پرایمرهای طراحی شده جهت بررسی میکرو RNA ها

نام میکرو RNA	توالی پرایمر	طول محصول
has-miR-155	TTAATGCTAATCGTGATAGGG	۲۱bp
has-miR-520-3p	AAAGTGCTTCCTTTAGAGGG	۲۱bp
has-miR-10b	TACCCTGTAGAACCGAATTTG	۲۱bp
has-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAG	۲۲bp
BKPYV-miR-B1-3p	TGCTTGATCCATGTCCAGAGTC	۲۲bp
BKPYV-miR-B1-5p	ATCTGAGACTTGGGAAGAGC	۲۰bp
has-miR-U6	CTCGCTTCGGCAGCAC	۱۷bp

تجزیه و تحلیل داده ها

برای تمامی داده ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۳ استفاده شد. برای اندازه گیری سطح بیان mRNA هر ژن مورد مطالعه از روش لیواک ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) استفاده شد. آزمون های ناپارامتریک برای تجزیه و تحلیل تفاوت سطوح بیان بین گروه های مختلف بیماران انتخاب شد. همچنین برای ارزیابی رابطه بین متغیرها از تحلیل

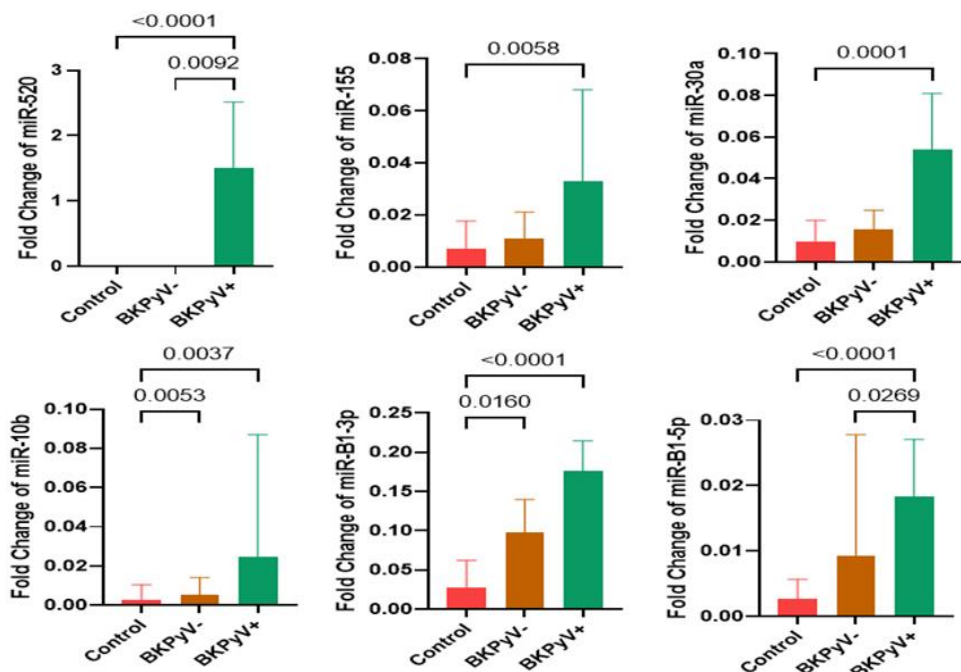
همبستگی اسپیرمن (دو طرفه) استفاده شد. از نرم افزار GraphPad Prism (نرم افزار USA, CA, Prism ۹/۰۱) برای بررسی متغیرهای پیوسته از آزمون Mann-Whitney و برای مقایسه گروه های مختلف با یکدیگر از ANOVA استفاده شد. در این تحقیق سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقایسه میزان بیان میکروRNAهای مورد مطالعه

سطح بیان miR-520 در گروه بیماران با عفونت فعال ویروسی به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه بیماران بدون عفونت فعال ویروسی بود ($P=0/0092$)، بیان miR-155 در گروه بیماران با عفونت فعال ویروسی به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه افراد سالم بود ($P=0/0058$)، بیان miR-30a در گروه بیماران با عفونت فعال ویروسی به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه افراد سالم بود ($P=0/0001$)، بیان miR-10b در گروه

بیماران با عفونت فعال ویروسی به‌طور قابل توجهی بالاتر از افراد سالم بود ($P=0/0037$). همچنین دو میکروRNA ویروس BKPyV، miR-B1-3p، در گروه بیماران با عفونت فعال ویروسی به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه سالم بود ($P<0/0001$) و miR-B1-5p در گروه بیماران با عفونت فعال ویروسی به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه بیماران بدون عفونت فعال ویروسی بود ($P=0/0269$). نتایج مقایسه سطح بیان میکروRNAها در شکل ۱ و جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱) مقایسه سطح بیان میکروRNAهای مورد مطالعه در افراد سالم، و بیماران پیوند کلیه شده با و بدون عفونت فعال ویروسی

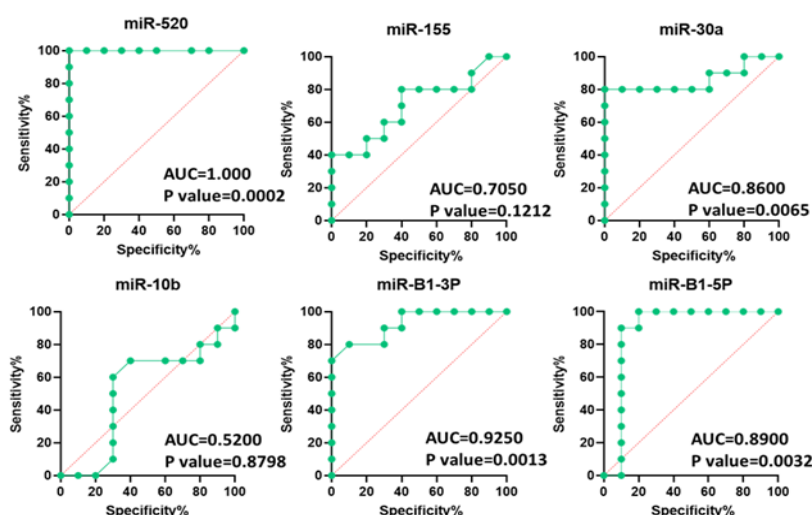
Fig 1) Comparison of the expression level of studied microRNAs in healthy individuals and kidney transplant patients with and without active viral infection.

جدول ۲) مقایسه میانگین سطح بیان میکرو RNAهای مورد مطالعه در افراد سالم و بیماران پیوند کلیه شده با و بدون عفونت فعال BKPyV			
بیماران پیوند کلیه شده بدون عفونت فعال BKPyV	بیماران پیوند کلیه شده با عفونت فعال BKPyV	افراد سالم	میکرو RNA
۰/۰۵ ± ۰/۰۸	۱/۰۵ ± ۱/۰۱	۰/۰۴ ± ۰/۰۶	miR-۵۲۰
۰/۰۳ ± ۰/۰۳	۰/۰۱ ± ۰/۰۱	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	miR-۱۵۵
۰/۰۵ ± ۰/۰۲	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۹	۰/۰۱ ± ۰/۰۱	miR-3۰a
۰/۰۰۸ ± ۰/۰۱	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۶	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۶	miR-۱۰b
۰/۰۹ ± ۰/۰۴	۰/۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۰۲ ± ۰/۰۳	miR-B1-3p
۰/۰۰۹ ± ۰/۰۱	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۸	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۳	miR-B1-5p

آنالیز منحنی مشخصه (ROC) در میکرو RNAهای مورد مطالعه

منحنی مشخصه برای بیان میکرو RNAهای مورد مطالعه بین گروه بیماران با و بدون عفونت فعال ویروسی در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج این

آنالیز نشان می‌دهد که بین گروه بیماران با و بدون عفونت فعال ویروسی، بیان miR-520 ($P=۰/۰۰۰۲$)، miR-30a ($P=۰/۰۰۰۲$)، miR-B1-3p ($P=۰/۰۰۱۳$) و miR-B1-5p ($P=۰/۰۰۳۲$) سطح زیر نمودار قابل قبول بود.

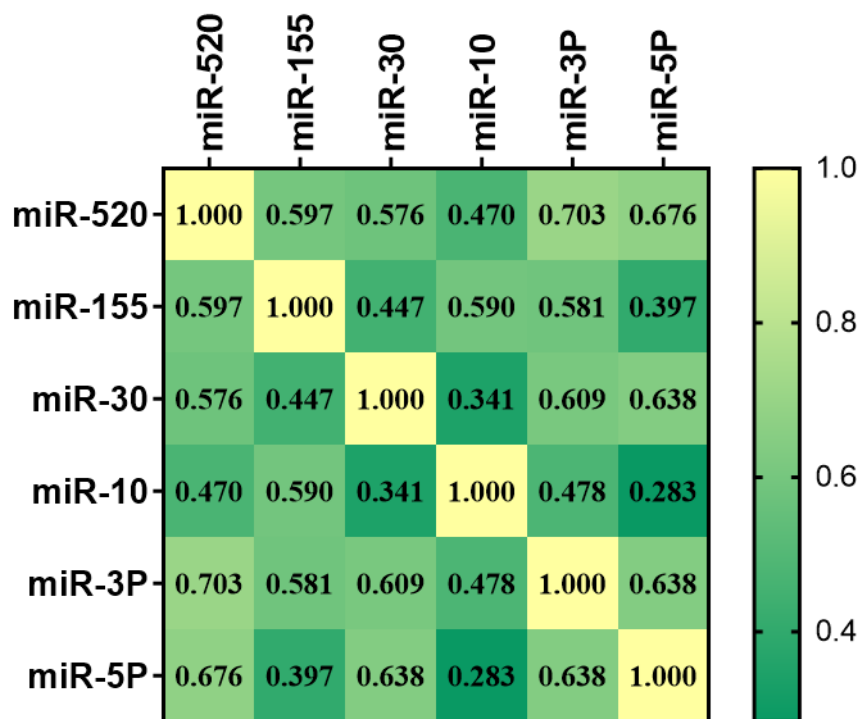


شکل ۲) منحنی مشخصه ROC برای بیان میکرو RNAهای مورد مطالعه در افراد سالم و بیماران پیوند کلیه شده با و بدون عفونت فعال ویروسی.

Fig 2) Characteristic ROC curve for the expression of studied microRNAs in healthy subjects and kidney transplant patients with and without active viral infection.

آنالیز نقشه حرارتی با استفاده از آزمون همبستگی اسپیرمن برای میکرو RNAهای مورد مطالعه نقشه حرارتی با استفاده از آزمون اسپیرمن بیان میکرو RNAهای مورد بررسی در افراد با عفونت فعال ویروسی در شکل ۳ نشان داده شده است. همبستگی با

میزان کمتر با رنگ سبز پر رنگ و همبستگی با شدت بیشتر با رنگ سبز کم‌رنگ نمایان است. بخش‌های گرم رنگ همبستگی خود به خود را برای داده‌های بیان miRNAهای مورد بررسی ما نشان داد و ضرایب بین ۰ تا +۱ بود.



شکل ۳) نقشه حرارتی با استفاده از آزمون همبستگی اسپیرمن برای میکروRNAهای مورد مطالعه در بیماران پیوند کلیه با عفونت فعال ویروسی.
Fig 3) Heat map using Spearman's correlation test for studied microRNAs in kidney transplant patients with active viral infection.

بحث

پیوند کلیه (KT) یک عامل اپیدمیولوژیک مهم در جمعیت عمومی است. این یک روش نجات دهنده است و تنها جایگزین دیالیز مادام‌العمر برای بیمارانی است که در مرحله نهایی اختلال عملکرد کلیه (اورمی یا بیماری کلیوی مرحله نهایی (ESRD) هستند (۱۲). در مجموع ۸۰۹۲۶ مورد KT در سال ۲۰۲۰ به پایگاه جهانی اهدا و پیوند (GODT) گزارش شد (۵). یک مشکل عمده با KT این است که عضو پیوند شده ممکن است از بین برود و در نتیجه بیماران به وضعیت ESRD بازگردند (۱۳) آسیب حاد کلیه (AKI) با عوارض قابل توجهی همراه است و قبلاً به عنوان یک عامل خطر مستقل برای مرگ و میر بیماران شناسایی شده بود (۱۴)، پس از پیوند و رد حاد سلولی (ACR) اغلب در ۶ ماه

اول پس از پیوند رخ می‌دهد (۱۵). (BKPyV) BK polyomavirus عضو از خانواده ویروس‌های DNA دو رشته‌ای (dsDNA) Polyomaviridae است. اعضای مختلف خانواده گونه‌های مختلف پستانداران، نخستی‌ها، جوندگان و پرندگان را آلوده می‌کنند. BKPyV باعث عفونت شایع دوران کودکی بدون عواقب بالینی عمده می‌شود و ۸۰ درصد بزرگسالان سرم مثبت هستند (۱۶). پس از عفونت اولیه، BKPyV غیرفعال باقی می‌ماند و عوارض قابل توجهی در افراد سالم ایجاد نمی‌کند (۴). فعال شدن مجدد BKPyV نهفته از نظر بالینی در برخی از افراد سرکوب شده سیستم ایمنی رخ می‌دهد، مانند عفونت HIV یا پیوند گیرندگان پیوند کلیه (KTRs) جمعیت بیمارانی را تشکیل می‌دهند که اغلب عوارض فعال‌سازی مجدد

BKPyV را تجربه می‌کنند و میانگین ۱۹/۵ درصد از KTRها ویرمی پس از پیوند را تجربه می‌کنند. بخشی از این گیرندگان به نفروپاتی مرتبط با BKPyV (BKVAN) مبتلا خواهند شد که با خطر قابل توجهی از دست دادن آلوگراف همراه است (۷). هدف اصلی این مطالعه بررسی miRNAهای کد شده توسط ژنوم BKPyV و میزبان این ویروس در محیط عفونت BKPyV می‌باشد. با توجه به اینکه BKPyV یک پاتوژن مهم در بیماران دریافت کننده پیوند کلیه است و تنظیم miRNAهای کد شده توسط BKPyV به خوبی درک نشده است. بنابراین ارزش بالقوه miRNAها به عنوان نشانگرهای زیستی ویروسی و شبکه تنظیمی تولید شده توسط بیان آن‌ها در طول فعل و انفعالات میزبان ویروسی نیاز به توجه بیشتری دارد زیرا هیچ داروی تأیید شده‌ای برای درمان بیماری‌های مرتبط به BKPyV در افراد پیوند کلیه شده وجود ندارد. از این رو شناخت حقایق پیچیده در مورد تأثیر عفونت BKPyV بر توزیع miRNA و mRNAها در سلول میزبان و ویروس حیاتی است (۱۷). بعد از عفونت BKPyV، در شبکه mRNA/miRNA/IFN-، IFN- با استفاده از گیرنده خود مولکول STAT را فعال می‌کند که می‌تواند تولید برخی از miRNAهای میزبان از جمله has-miR-520 و has-miR-155 را القا کند. همچنین نشان داده شده است که افزایش تولید hsa-miR-520 توانایی ضد ویروسی سلول‌های NK را به دلیل کاهش تولید MICA با هدف قرار دادن آن کاهش می‌دهد. از طرفی افزایش has-miR-155 نهایت می‌تواند تولید ژن‌های ضد ویروسی مانند MxA و ISG15 را افزایش دهد (۱۱). شناخت بیولوژی BKPyV برای توسعه درمان‌های مؤثرتر مانند رونوشت سلول میزبان و همچنین مطالعه تغییرات بیان پس از

ترجمه و مطالعه برهمکنش پروتئین‌ها با سایر ملکول‌ها در طول BKPyVN ضروری است. بیان دو miRNA بالغ (miR-B1-5p, miR-B1-3p) در سیستم مطالعه آزمایشگاهی در افراد پیوند کلیه شده به دلیل ناسازگاری در یافته‌ها آسان نیست (۱۸). با توجه به اثرات miR-B1-5p و miR-B1-3p و بر روی پروتئین‌های ویروسی مثل T-Ag در افراد پیوند کلیه شده که دارای تکثیر فعال ویروس هستند، این تأثیر موجب کاهش تولید پروتئینی می‌شود که CD8+ سلول‌های T را هدف قرار می‌دهد و به فرار ویروس از سیستم ایمنی کمک می‌کند. بر این اساس اندازه‌گیری miRNAهای ویروسی برای یافتن اثر نهایی آن‌ها بر چرخه زندگی ویروس حیاتی است (۱۹).

طبق نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، افزایش معنادار miRNAهای BKPyV در افراد دریافت کننده پیوند کلیه با عفونت فعال ویروسی در قیاس با افراد دریافت کننده پیوند کلیه بدون عفونت فعال ویروسی و افراد کنترل را شاهد بودیم. زنگ (Zeng) و همکاران، در مطالعه‌ای به بررسی miRNAهای BKPyV و میزبان ویروس پرداختند و مشخص کردند که miRNAهای کد شده توسط BKPyV در افراد دریافت کننده پیوند کلیه با عفونت فعال ویروسی افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد که این نتیجه مطابقت کامل با مطالعه ما دارد (۱۷). طبق نتایج حاصل از مطالعه حاضر افزایش قابل توجهی را در miRNAهای miR-155 و miR-520 بعد از عفونت BKPyV در افراد دریافت کننده پیوند کلیه با عفونت فعال ویروسی مشاهده شد. مطالعه کیم (Kim) و همکاران، بررسی miRNAها در افراد رد پیوند کلیه شده با واسطه سلول‌های T در قیاس با افراد کنترل مشخص کرد که hsa-miR-155 در افراد ATCMR

در مقایسه با افراد کنترل افزایش داشته است که با مطالعه ما مطابقت دارد.

همچنین ویلفینگسدر (Wilflingseder) و همکاران، در بررسی miRNA های افراد رد حاد و کنترل دریافتند که hsa-miR-520 در افراد رد حاد افزایش یافته است که با مطالعه ما تطبیق دارد (۲۰). در مطالعه انجام شده افزایش بیان در has-miR-10b و has-miR-30a را شاهد بودیم که با مطالعات لی (Li) و همکاران مطابقت دارد. در مطالعه لی و همکاران نشان داده شده است که با توجه به اینکه، TGFBR1 یکی از اجزای کلیدی سیگنال دهی TGF-β/Smad، نیز مستقیماً توسط miR-10 a / b تنظیم می‌شود، miR-10 با سرکوب مسیر TGF- /Smad، باعث ایجاد اثر ضد فیبروتیک بسیار قوی می‌شود (۲۱). بنابراین miR-10 می‌تواند فیروز کلیه را از طریق هدف قرار دادن مستقیم TGFBR1 و تنظیم سیگنالینگ TGF-/Smad را تنظیم کند. این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد و نشان می‌دهد افزایش miR-10 می‌تواند بینش جدیدی در مورد پاتوژنز DKD ارائه کند و نشان می‌دهد هدف قرار دادن miR-10 a/b ممکن است یک رویکرد درمانی مؤثر برای درمان DKD باشد (۲۲).

EMT یک فرآیند کلیدی در طول توسعه تومور و متاستاز است. miRNA ها در تعدادی از فرآیندهای بیولوژیکی ضروری از جمله EMT نقش دارند و اختلال در تنظیم آن‌ها با تومورزایی مرتبط است. در این مطالعه مشاهده شد که بیان بیش از حد اعضای خانواده miR-30 در سلول‌های A ۵۴۹ و PC-۹ باعث مهار EMT می‌شود (۲۳). عفونت‌های BKPyV باعث ایجاد اثرات EMT می‌شود (۲۴). بنابراین، مسدود

کردن مسیرهای EMT می‌تواند عملکرد BKPyV را برای ترویج تکثیر سلول‌های تومور و تهاجم مهار کند (۱۰). طبق نتایج حاصل از این تحقیق افزایش قابل توجهی را در miR-30a شاهد بودیم که این نتایج با مطالعات زنگ و همکاران مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر به بررسی بیان دو miRNA بالغ تولید شده توسط BKPyV (miR-B1-3p, miR-B1-5p) و همچنین بیان چند miRNA میزبان BKPyV که miR-10b, miR-30a, miR-520, miR-155، پرداخته است که افزایش بیان معناداری را در miR-520 و miR-155 و همچنین miR-B1-5p، miR-B1-3p و miR-10b، miR-30a را در افراد پیوند کلیه با عفونت فعال و ویروسی نسبت به افراد پیوند کلیه شده بدون عفونت فعال و ویروسی مشاهده شد.

سپاس و قدردانی

با تشکر از اعضای محترم مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا دانشگاه علوم پزشکی شیراز، اساتید گرانقدرم دکتر عیسی جرجانی، دکتر رامین یعقوبی، دکتر افسون افشاری، دکتر حسین صبوری.

این مقاله تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد طرح ۲۳۹۰۶ انجام شده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Pattar SK, Greenway SC. Circulating nucleic acids as biomarkers for allograft injury after

solid organ transplantation: current state-of-the-art. Transpl Res Risk Manag 2019; 17-27.

<https://doi.org/10.2147/TRRM.S204233>.

2. Sawinski D, Goral S. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(2): 209-17.
doi: [10.1093/ndt/gfu023](https://doi.org/10.1093/ndt/gfu023).
3. Afshari A, Yaghobi R, Rezaei G. Inter-regulatory role of microRNAs in interaction between viruses and stem cells. *World J Stem Cells* 2021; 13(8): 985-1004.
doi: [10.4252/wjsc.v13.i8.985](https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i8.985).
4. Soltaninejad E, Nicknam MH, Nafar M, et al. Altered expression of microRNAs following chronic allograft dysfunction with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015; 14(6): 615-23.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26725559/>.
5. Golsha R, Gooran Orimi A, Khodabakhshi B, et al. Prevalence of infectious diseases in patients with end stage renal disease in Gorgan City in Iran. *Tehran Univ Med J* 2020; 78(4): 233-8. (Persian)
URL: <http://tumj.tums.ac.ir/article-1-10538-en.html>.
6. Li JY, McNicholas K, Yong TY, et al. BK virus encoded microRNAs are present in blood of renal transplant recipients with BK viral nephropathy. *Am J Transplant* 2014; 14(5): 1183-90.
doi: [10.1111/ajt.12694](https://doi.org/10.1111/ajt.12694).
7. Haddad G, Kölling M, Lorenzen JM. The hypoxic kidney: pathogenesis and noncoding RNA-based therapeutic strategies. *Swiss Med Wkly* 2019; 149: w14703.
doi: [10.4414/sm.w.2019.14703](https://doi.org/10.4414/sm.w.2019.14703).
8. Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, et al. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Front Immunol* 2015; 6: 6.
doi: [10.3389/fimmu.2015.00006](https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00006).
9. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 402.
doi: [10.3389/fendo.2018.00402](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402).
10. Zeng G, Wang Z, Huang Y, et al. Cellular and viral miRNA expression in polyomavirus BK infection. *Transpl Infect Dis* 2019; 21(5): e13159.
doi: [10.1111/tid.13159](https://doi.org/10.1111/tid.13159).
11. Yaghobi R, Afshari A, Roozbeh J. Host and viral RNA dysregulation during BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2023; 14(4): e1769.
doi: [10.1002/wrna.1769](https://doi.org/10.1002/wrna.1769).
12. Kariminik A, Yaghobi R, Dabiri S. Innate immunity and BK virus: prospective strategies. *Viral Immunol* 2016; 29(2): 74-82.
doi: [10.1089/vim.2015.0099](https://doi.org/10.1089/vim.2015.0099).
13. Foroudi MR, Yaghobi R, Afshari A, et al. The effect of the BK polyomavirus large T antigen on the function and maturity of the CD4+ T cell subsets in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 2023; 80: 101884.
doi: [10.1016/j.trim.2023.101884](https://doi.org/10.1016/j.trim.2023.101884).
14. Foroudi MR, Yaghobi R, Afshari A, et al. The effect of BK polyomavirus large T antigen on CD4 and CD8 T cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 2022; 74: 101655.
doi: [10.1016/j.trim.2022.101655](https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101655).
15. Sun IO, Lerman LO. Urinary microRNA in kidney disease: Utility and roles. *Am J Physiol Renal Physiol* 2019; 316(5): F785-F793.
doi: [10.1152/ajprenal.00368.2018](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00368.2018).
16. Noshadi N, Yaghoubi R, Afshari A, et al. Impaired CD4+ Cytotoxic T Lymphocyte Activity in Polyomavirus BK Infected Kidney Transplant Recipients. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2023; 22(4): 379-389.
doi: [10.18502/ijaai.v22i4.13610](https://doi.org/10.18502/ijaai.v22i4.13610).
17. Zou W, Imperiale MJ. Biology of polyomavirus miRNA. *Front Microbiol* 2021; 12: 662892.
doi: [10.3389/fmicb.2021.662892](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662892).
18. Bauman Y, Nachmani D, Vitsenshtein A, et al. An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe* 2011; 9(2): 93-102.
doi: [10.1016/j.chom.2011.01.008](https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.008).

19. Huang Y, Zeng G, Randhawa PS. Detection of BKV encoded mature MicroRNAs in kidney transplant patients: Clinical and biologic insights. *J Clin Virol* 2019; 119: 6-10.
doi: [10.1016/j.jcv.2019.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.07.006).
20. Wilflingseder J, Regele H, Perco P, et al. miRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation* 2013; 95(6): 835-41.
doi: [10.1097/TP.0b013e318280b385](https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318280b385).
21. Li J, Yue S, Fang J, et al. MicroRNA-10a/b inhibit TGF- β /Smad-induced renal fibrosis by targeting TGF- β receptor 1 in diabetic kidney disease. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022; 28: 488-99.
doi: [10.1016/j.omtn.2022.04.002](https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.04.002).
22. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141(4): 1202-7.
doi: [10.1016/j.jaci.2017.08.034](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034).
23. Song K, Jiang Y, Zhao Y, et al. Members of the miR-30 family inhibit the epithelial-to-mesenchymal transition of non-small-cell lung cancer cells by suppressing XB130 expression levels. *Oncol Lett* 2020; 20(4): 68.
doi: [10.3892/ol.2020.11929](https://doi.org/10.3892/ol.2020.11929).
24. Mahmudpour M, Nabipour I, Esmailie AH, et al. A Case of Systemic Lupus Erythematosus with Renal Failure Following the Administration of Sinopharm COVID -19 Vaccine. *Iran South Med J* 2022; 25(3): 277-284. (Persian)
doi: [10.52547/ismj.25.3.277](https://doi.org/10.52547/ismj.25.3.277).

Original Article

The Effect of BK Virus and Host Cell MicroRNAs in Kidney Transplant

R. Sepahi (MSc)^{1*}, E. Jorjani (PhD)¹, A. Afshari (PhD)^{2}, H. Sabouri (PhD)³,
R. Yaghobi (PhD)⁴**

¹Department of Biology, School of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad-E Kavous, Iran

² Shiraz Nephro-Urology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

³Department of Plant Production, School of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad-E Kavous, Iran

⁴ Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

(Received 2 Jan, 2024

Accepted 5 Feb, 2024)

Abstract

Background: Polyomavirus BK is one of the life-threatening infections in kidney transplant recipients. The activation of this virus can eventually lead to the loss of the graft. There are very few studies on the expression level of BK virus microRNAs. Therefore, in this study, we investigated the function of BK virus microRNAs and their effect on host cell microRNAs' expression level. BK virus encodes two microRNAs, namely miR-B1-3p and miR-B1-5p. Therefore, it is crucial to study these microRNAs as markers of viral infection and their regulation. So far, there is no approved drug or vaccine to treat BK virus infection. Consequently, understanding the relationship between BK virus and host cell microRNAs is integral to the control of infection in kidney transplant patients.

Materials and Methods: In this study, ten tissue samples from kidney transplant recipients with symptoms of BK virus nephropathy, ten urine samples from kidney transplant patients without active BK virus infection, and 20 healthy individuals were included. The expression level of the studied microRNAs was measured in all the samples using SYBR Green Real-time PCR.

Results: The results showed that the expression level of the studied microRNAs, including miR-B1-3p, miR-B1-5p, miR-155, miR-520, miR-10b, miR-30a in the tissue samples of kidney transplant patients with BK virus nephropathy symptoms were significantly increased compared to kidney transplant patients without active BK virus infection.

Conclusion: The assessment of some microRNAs, such as miR-520, miR-30a, and miR-B1-3p/5p, may assist in the prediction and prevention of BKPyV activation in KTRs, particularly in urine samples.

Keywords: Kidney transplant, BK virus, Micro RNA, Nephropathy, miR-B1-3p, miR-B1-5p

©Iran South Med J. All rights reserved

Cite this article as: Sepahi R, Jorjani E, Afshari A, Sabouri H, Yaghobi R. The Effect of BK Virus and Host Cell MicroRNAs in Kidney Transplant. Iran South Med J 2023; 26(4): 212-223

****Address for correspondence:** Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Email: afsafshari@yahoo.com

*ORCID: 0009-0003-2894-4273

**ORCID: 0000-0002-6086-3612

Website: <http://bpums.ac.ir>
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>