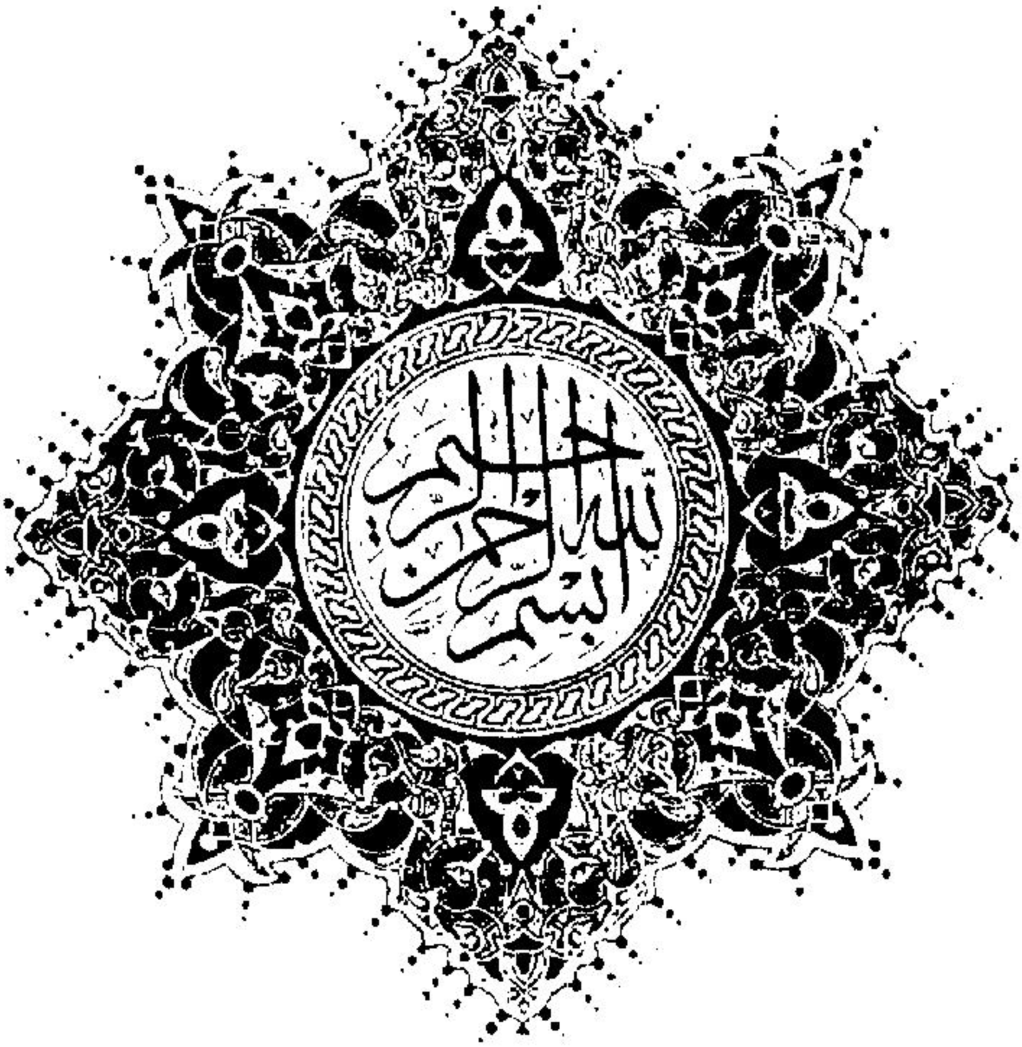

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دانشکده پزشکی

پایاننامه جهت دریافت درجه دکترای فوق تخصصی نفرولوژی

بررسی ارتباط MicroRNA-125a و MicroRNA-146a با فعالیت بیماری و یافته‌های پاتولوژی در بیماران با نفریت لوپوسی

نگارش:

دکتر هنگامه جمشیدی

استادان راهنما:

دکتر سیما عابدی آذر

دکتر محمدرضا جعفری نخجوانی

مهر ماه ۱۳۹۶

شماره پایاننامه:

تقدیم به

پدر بزرگوارم و مادر عزیزتر از جانم

که دعای خیرشان

یاری گر تمام لحظات من بوده است

و

همسر عزیزم

همیشه در کنار من مایه دلگرمی و حامی من بوده است.

فهرست مطالب: شماره صفحه

خلاصه فارسی ۱

- فصل اول:

مقدمه ۳

- فصل دوم:

مروری بر متون ۷

- فصل سوم:

مواد و روش کار ۱۳

- فصل چهارم:

یافته ها ۱۹

- فصل پنجم:

بحث ۲۶

نتیجه گیری ۳۳

پیشنهادات ۳۴

منابع ۳۵

فهرست جداول: شماره صفحه

(جدول شماره ۱-٤) ۲۰

ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی

(جدول شماره ۲-٤) ۲۱

ارتباط بیان ژن با ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی

فهرست نمودارها: شماره صفحه

(نمودار شماره ۱–٤) ۲۲

ارتباط میزان بیان miR-146a با میزان anti-dsDNA

(نمودار شماره ۲–٤) ۲۳

ارتباط میزان بیان miR-146a با میزان پروتئین اوری ۲٤ ساعته

(نمودار شماره ۳–٤) ۲٤

منحنی ROC بیان miR-125a در تشخیص بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی

(نمودار شماره ٤–٤) ۲۵

منحنی ROC بیان miR-146a در تشخیص بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی

Abbreviations:

ESRD: End-Stage Renal Disease

RA: Rheumatoid Arthritis

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

SLEDI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

خلاصه

مقدمه

نفریت لوپوسی یکی از عوارض نسبتا شایع لوپوس در سطح جهان می‌باشد و یکی از مشکلات اساسی سیستم بهداشتی-درمانی محسوب می‌شود. نقش ژن‌ها در بروز انواع بیماری‌های اتوایمیون اثبات شده است. برخی از مطالعات به نقش ژن‌های miR-125a و miR-146a در لوپوس اشاره کرده‌اند. هدف از انجام مطالعه حاضر؛ بررسی ارتباط سطح ادراری MicroRNA-125a و MicroRNA-146a با فعالیت بیماری و یافته‌های پاتولوژی در بیماران همراه با نفریت لوپوسی می‌باشد.

مواد و روشها

در یک مطالعه توصیفی تحلیلی، ۳۰ نفر از بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی که جهت انجام اقدامات تشخیصی و درمانی به کلینیک مرکز آموزشی درمانی امام رضا دانشگاه علوم پزشکی تبریز مراجعه کرده بودند و و ۳۰ نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. در هر دو گروه بعد از استخراج RNA، سطح ادراری MicroRNA-125a و MicroRNA-146a با استفاده از RT PCR کمی تعیین گردید. سن، جنس، فعالیت بیماری، و یافته‌های آزمایشگاهی بیماران مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

میانگین سطح miR-125a و miR-146a به ترتیب در ادرار بیماران گروه مورد ۱/۳۹±۳٦/٦۸ و ۲/۳۳±۳٤/۹٤ بود، و در گروه کنترل ۱/٦٤±۳۳/۷۹ و ۱/۷۵±۳۱/۸۵ بود. سطح ادراری miR-125a (P=0.001)و miR-146a (P=0.001) در گروه بیماران به میزان

معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. سطح ادراری miR-146a با میزان anti-dsDNA ارتباط مستقیم معنی‌دار آماری (r=0.475، P=0.014)، و با میزان پروتئین اوری ۲٤ ساعته ارتباط معکوس معنی‌دار آماری (r=-0.389، P=0.049) داشت.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، ژن‌های miR-125a و miR-146a احتمالا در پاتوژنز و پیشرفت نفریت لوپوسی نقش دارد و می‌توانند به عنوان مارکر تشخیصی و درمانی در نفریت لوپوسی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: *نفریت لوپوسی، فعالیت بیماری، miR-125a، miR-146a.*

مقدمه

مقدمه، اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق:

بیماری لوپوس یک بیماری اتوایمیون است که در آن تولرانس به آنتی ژن‌های خودی از بین رفته و رسوب اتوآنتی بادی‌ها در غشاء پایه گلومرولی منجر به گلومرولونفریت به واسطه ایمنی می‌گردد. نفریت لوپوسی به عنوان بزرگ ترین عامل مورتالیته و موربیدیته در بیماران لوپوسی که تا ۷۰٪ این بیماران را تحت تاثیر قرار می دهد و بسته به شدت بیماری ۳۰-۱۵٪ از بیماران لوپوسی به طرف ESRD[1] پیشرفت می‌کنند (۱، ۲).

مشخص شده است که فاکتورهای ژنتیکی در کنار فاکتورهای محیطی شناخته شده و ناشناخته همراه شده و منجر به ایجاد نفریت لوپوسی می‌گردد. مطالعات نشان داده است که نقص‌های اپی‌ژنتیک نقش مهمی در پاتوژنز لوپوس دارند. اپی‌ژنتیک‌ها که تنظیم میکروRNAها را شامل می‌شود به تغییرات Stable و heritable بیان ژن‌ها اطلاق می‌شود که فتوتیپ را تغییر داده ولی DNA Sequence را تغییر نمی‌دهند (۳، ٤)، و در پاسخ های ایمنی innate and adaptive نیز نقش کلیدی دارند (۵). به عنوان مثال میکروRNAها می‌توانند بیان پروانفلاماتوری سیتوکین‌ها را تحریک کرده و شدت و زمان پاسخ ایمنی را تعیین کنند (٦).

MicroRNA-146a میکروRNAای است که در سلول‌های Th_1 و Th_2 بیان می‌شود در مطالعات نشان داده است که نبود MicroRNA-146a در موش‌ها سبب افزایش Treg cells ها می‌شود و عملکرد ساپرس کننده آن‌ها مختل می‌گردد. این Treg cell های بدون

---

[1] End-stage renal disease

MicroRNA-146a توانایی تولید سیتوکین‌های پروانفلاماتوری همانند اینترفرون γ را پیدا می‌کنند و کمبود MicroRNA-146a در Treg cell ها منجر به افزایش و تولید Stat شده که فاکتور transcription کلیدی برای تمایز سلول‌های Th_1 است و به این دلیل است که MicroRNA-146a عملکرد سلول Tregساپرسور را تنظیم می‌کند، و در پروگنوز بیماری لوپوس نقش مهم تنظیم کننده بر عهده دارد. داروی ضد التهابی کلسیتریول با اثر برروی MicroRNA-146a که در بیماران مبتلا به لوپوس down regulate شده است بیان MicroRNA-146a را در بیماران مبتلا به لوپوس تغییر می‌دهد و پس از درمان با کلسیتریول MicroRNA-146a در بیماران به مقدار چشمگیری افزایش می‌یابد (۷، ۸).

از طرفی باتوجه به آن که بیان MicroRNA-146a در بیماران لوپوسی کاهش می‌یابد، باعث افزایش تولید KLFB توسط سلول‌های T نیز می‌شود و MicroRNA-125a دارای siteهای باند شونده در JUTR در KLFIS می‌باشد که به خانواده‌هایی از فاکتورهای transcription که بیان سیتوکین RANTES در سلول‌های T را تنظیم می‌کند، تعلق دارد (۹).

با توجه به اهمیت نفریت لوپوسی و اهمیت تعیین پروگنوز این بیماران؛ در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا سطح MicorRNA-125a و MicroRNA-146a در نمونه اداری بیماران را همراه با فعالیت بیماری و یافته‌های پاتولوژی در بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی مورد بررسی قرار دهیم و ارتباط سطح این میکروRNAها در ادار بیماران با فعالیت بیماری و یافته‌های پاتولوژی را مورد بررسی و ارزیابی قرار دهیم.

هدف کلی:

تعیین نقش MicorRNA-125a و MicroRNA-146a با فعالیت بیماری و یافته‌های پاتولوژی در بیماران با نفریت لوپوسی.

اهداف اختصاصی:

۱. بررسی پاتولوژیک اندکس Chronisity در پاتولوژی بیماران لوپوسی با نفریت لوپوسی.
۲. تعیین بیان MicorRNA-125a و MicroRNA-146a در بیماران با نفریت لوپوسی.
۳. تعیین ارتباط اندکس Chronisity با میزان بیان MicorRNA-125a و MicroRNA-146a در بیماران با نفریت لوپوسی.

اهداف کاربردی:

مطالعه حاضر، با هدف بررسی میزان بیان MicroRNA-125a و MicroRNA-146a در ادرار بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی طراحی شده است. در خصوص لزوم اجرای مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد که، لوپوس از جمله بیماری‌های نسبتا شایع منطقه ما می‌باشد. با توجه به نقش و دخالت عوامل ژنتیکی در بروز این بیماری، بررسی ارتباط بیان MicroRNA-125a و MicroRNA-146a در ادرار بیماران با فعالیت بیماری، می‌تواند به عنوان یک روش ارزیابی غیر تهاجمی در تعیین اقدامات درمانی مورد نیاز کمک کننده باشد.

فرضیات:

۱. اندکس Chronisity با میزان بیان MicorRNA-125a و MicroRNA-146a در بیماران با نفریت لوپوسی ارتباط دارد.

تعریف واژه‌های اختصاصی:

نفریت لوپوسی: افزایش سلول‌های مزانژیال، تولید بیش از حد ماتریکس سلولی، و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در کلیه که منجر به فیبروز و اسکلروز کلیه می‌گردد (۱، ۲).

MicorRNA: میکرو RNAها، RNAهای کوچکی هستند که کد نمی‌شوند و به ناحیه ´۳ بیان نشده mRNAهای هدف متصل می‌شوند و منجر به post transcriptional gene modulation می‌گردند (۵-۳).

مروری بر متون

مروری بر متون

میکرو RNAها طول بسیار کوتاهی دارند اما در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک بدن نقش‌های مهمی را ایفا می‌کنند. بسیاری از این میکرو RNAهای شناخته شده در توسعه، تمایز و پاسخ دهی سیستم ایمنی بدن در شرایط مختلف اهمیت ویژه‌ای دارند (۱۰). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی نقش میکرو RNAها در بیماری‌های مختلفی نظیر کانسرها و بیماری‌های خود ایمنی صورت گرفته است. در طی این مطالعات گسترده نقش میکروRNAها در ایمنی بدن مورد بررسی و تایید بیشتر واقع شده است (۱۰-٦).

خصوصیات میکروRNAها:

میکروRNA، RNAهای کوچک غیرکد کننده‌ای هستند که تقریباً ۱۹ تا ۲٤ نوکلئوتید طول دارند (۱۱). در میان RNAهای کوچک شناخته شده، میکرو RNAها، بزرگ‌ترین گروه طبقه بندی شده به لحاظ تعداد، تنوع، روش بیان، و عملکرد هستند. این RNAهای کوچک غیر کد کننده تنظیم بیان ژن‌ها را در سطح پس از رونویسی انجام می‌دهند. این تنظیم، با تجزیه و یا با جلوگیری از ترجمه mRNA هدف صورت می‌گیرد (۱۲).

میکرو RNAها در محدوده وسیعی از گونه‌های وجود دارند. در انسان تقریباً ۱۵۰۰ میکرو RNA کشف شده وجود دارد. ژن‌های میکرو RNAها در حدود ۳ درصد از کل ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند که ممکن است تعداد این ژن‌ها به هزاران عدد برسد (٦، ۱۳). لازم به ذکر است که در مراحل اولیه حیات، میکرو RNAهای محدودی بیان می‌شوند، اما هنگامی که

موجودات رشد کرده و بالغ می‌شوند و به انواع سلولی مختلفی تمایز می‌یابند، تعداد میکروRNAهای قابل تشخیص افزایش می‌یابد (۱۴).

میکرو RNAها نقش مهمی را در فرایندهای بیولوژیک مختلف همانند توسعه، تکثیر و تمایز سلولی، ایجاد کانسر، متابولیسم رگ‌زایی، و التهاب بازی می‌کنند (۱۵). عدم تنظیم بیان و عملکرد میکروRNAها با بیماری‌های مختلفی شامل کانسر، بیماری‌های قلبی، و انواع بیماری‌های خودایمنی در ارتباط است (۱۶). در واقع میکروRNAها نقش مهمی در تنظیم عملکردهای ایمونولوژیک شامل پاسخ‌های ایمنی اکتسابی و ذاتی، توسعه، و تمایز سلول‌های ایمنی دارند. به بیان دیگر این تنظیم کننده‌های کوچک بیان ژن‌ها، الگوهای خاصی برای بیان در بافت‌های خاص و همچنین در شرایط تمایزی، بیماری و غیره دارند (۱۷، ۱۸).

میکرو RNAها در ژنوم

ژن‌های میکرو RNAها در سرتاسر ژنوم انسان به جز کروموزوم Y شناسایی شده‌اند (۱۹). در حدود ۸۰ درصد از ژن‌های میکرو RNAهای انسانی در نواحی اینترونی حضور دارند، که آن‌ها را می‌توان هم در رشته کدکننده پروتئین و هم در رشته غیر کد کننده پروتئین پیدا کرد، و تنها حدود ۲۰ درصد از آن‌ها در نواحی اگزونی وجود دارند. برخی ژن‌های میکروRNAها می‌توانند میکروRNAهای اگزونی یا اینترونی باشند و این به الگوی پیرایش ژن‌های کد کننده بستگی دارد (۶). علاوه بر موارد ذکر شده می‌توان گفت که به طور کلی اغلب میکروRNAها از نواحی درون ژنی کد می‌شوند و برخی دیگر می‌توانند در جهت مخالف از روی ژن های دیگر کد شوند. به طور برجسته یک میکرو RNA می‌تواند چند صد

mRNA را مورد هدف قرار دهد و تصور می‌شود که بیان تقریباً ۵۰ درصد از تمام ژن‌های پستانداران به طور بسیار دقیق توسط میکروRNAها تنظیم می‌شود (۲۰). انواع مختلف فرایند کد شدن میکروRNAها نشان دهنده این است که آنها می‌توانند به صورت مستقل و یا همراه با ژن‌های میزبان کد شوند، به عنوان مثال miR-155 از درون اینترون ژن BIC کد می‌شود و بنابراین بیان آن به دنبال ژن BIC صورت می‌گیرد (۲۱).

نقش میکروRNAها در سیستم ایمنی

امروزه در دنیای مدرن با فراگیر شدن بیماری‌های خود ایمنی، مطالعات مختلفی برای حل این مشکل بزرگ در حال انجام است. بیماری‌هایی چون Multiple sclerosis یا Systemic lupus erythematosus با پیچیدگی‌های خاص خود چالش بزرگی را برای پژوهشگران ایجاد کرده‌اند. با مطالعات صورت گرفته در این زمینه مشخص شده است که میکرو RNAها در توسعه، تمایز و عملکرد سیستم ایمنی نقش دارند (۲۵-۲۰).

برخی از نقش‌های مهم میکرو RNA در سیستم ایمنی شامل: توسعه سیستم عصبی، حفاظت از سیستم عصبی، حفظ تحمل ایمنی، توسعه اجزا مختلف سیستم ایمنی، فعال‌سازی سیستم ایمنی، تنظیم عملکرد سلول‌های ایمنی، تمایز سلول‌های سیستم ایمنی، و تنظیم هدایت سیگنال دهی گیرنده‌های موجود در سیستم ایمنی است (۲۴، ۲۵).

نقش میکروRNAها در ایمنی ذاتی

میکرو RNAها علاوه بر نقش در توسعه سیستم ایمنی؛ برای عملکرد صحیح بازوهای ذاتی و اکتسابی سیستم ایمنی نیز حیاتی می‌باشند (۲۶، ۲۷). سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی

شامل گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژهای مشتق شده از مونوسیت‌ها و سلول های دندریتیک می‌باشند (۲۸). همه این سلول‌ها در پاتولوژی بیماری‌های خود ایمنی به نحوی نقش دارند. میکروRNAها علاوه بر نقش حیاتی در توسعه سلول‌های ایمنی ذاتی؛ پاسخ‌های ایمنی ذاتی را نیز به دقت تنظیم می‌کنند (۱۰، ۲۹).

نقش میکرو RNAها در ایمنی اکتسابی

لنفوسیت‌های T و B اجزا سلولی اصلی ایمنی اکتسابی هستند (۳۰). مطالعات انجام شده نقش miRNAها را در تنظیم توسعه و عملکرد لنفوسیت‌ها نشان داده‌اند (۳۱). بطور مثال میکرو RNAهای، miR-155، miR-150، و miR-146a در تمایز سلول‌های Th_1 و Th_2 از سلول‌های TCD^{4+} نقش دارند. حال با این فرض می‌توان در نظر گرفت که اگر تغییری در الگوی بیانی این میکرو RNAها اتفاق بیفتد، یا این که تحت تاثیر هر عاملی عملکرد هر کدام از آنها مختل شود چه تاثیرات سویی بر عملکرد دقیق سیستم ایمنی بدن خواهد داشت (۳۲).

در برخی از موارد، میکروRNAها نقش خود را با تنظیم بیان ژن‌ها و یا سلول‌هایی که خود تنظیم کننده اجزا سیستم ایمنی هستند، انجام می‌دهند. به طور مثال در سلول‌های T تنظیم کننده که فعالیت سلول‌های T عمل کننده را مهار می‌کنند، تا هموستاز سیستم ایمنی و فرآیند تحمل آنتی‌ژن‌های خودی را حفظ کنند، میکرو RNAها نقش موثری دارند (۲۵). در این سلول ها miR-146a بیان بسیاری بالایی دارد و به این وسیله پاسخ سلول‌های Th_1 به التهاب را که با تولید اینترفرون گاما همراه است، کنترل می‌کند (۳۳).

میکروRNAها در خود ایمنی

بر اساس نتایج مطالعات صورت گرفته؛ miRNAها هموستاز سیستم ایمنی را حفظ کرده و عملکرد ایمنی نرمال را سبب می‌شوند. بر این اساس این امکان وجود دارد که بیان تنظیم نشده miRNAها منجر به شکست تحمل ایمنی و ایجاد بیماری‌های خود ایمنی گردد (٦، ٣٤). مطالعات مرتبط صورت گرفته نشان داده‌اند؛ که تخریب سنتز miRNAها در سلول‌های Treg منجر به حذف کامل عملکرد تنظیم ایمنی Tregها شده و منجر به توسعه بیماری‌های التهابی و خود ایمنی کشنده می‌گردد (٣٣، ٣٥).

بر اساس مطالبی که بیان گردید؛ این مولکول‌ها می‌توانند در توسعه بیماری‌های التهابی و خود ایمنی نقش داشته باشند. بررسی گسترده ژنومی بیان miRNAها در پسوریازیس و Atopic Eczema که دو بیماری التهابی مزمن عمومی می‌باشند، اولین شواهد ارتباط بین سطوح تغییر یافته miRNA ها و بیماری‌های التهابی را آشکار کرده است (٣٦).

لوپوس ارتیماتوس منتشر (SLE[1]) یک بیماری خود ایمنی با منشا ناشناخته است که با درگیری اعضای مختلف مشخص می‌شود. درگیری کلیه یک عارضه شایع در این بیماری است و در حدود ٦٠ درصد از بالغین مبتلا به لوپوس در طول بیماری به درگیری کلیوی مبتلا خواهند شد. این درگیری چه به طور مستقیم و چه غیر مستقیم (از طریق درمان با مهارکننده‌های ایمنی) تاثیر عمده‌ای در نتیجه نهایی و پروگنوز بیماری دارد (٣٧). بین ١٠ تا ٢٠ درصد از بیماران مبتلا به لوپوس همراه با درگیری کلیوی، در طی ٥ تا ١٠ سال از شروع بیماری خود به سمت نارسایی کلیه پیش می‌روند (٣٨). تخمین زده شده است که مبتلایان به

---

[1] Systemic lupus erythematosus

لوپوس ۱ تا ۲ درصد از بیمارانی را تشکیل می‌دهند که سالیانه نیاز به درمان‌های جایگزین برای عملکرد کلیه به دلیل بروز ESRD پیدا می‌کنند (۳۹).

در یک مطالعه که توسط Carlsen و همکاران در کپنهاک دانمارک در سال ۲۰۱۳ میلادی بر روی بیماران مبتلا به SLE انجام گرفت؛ با بررسی میزان بیان تعدادی از miRNAها بیان کردند که میزان بروز miR-142-3p و miR-181a افزایش یافته بود و همچنین میزان بروز MiR-106a، miR-20a، miR-203 و miR-92a کاهش یافته بود و در بیماران مبتلا به SLE با نفریت فعال میزان miR-342-3P، miR203 و miR20a کاهش یافته بود (۳۷).

در مطالعه دیگری که توسط Wong و همکاران در دانشگاه Jinan در Guangdong چین در سال ۲۰۱۲ انجام گرفت؛ با بررسی سطح microRNA در بیماران مبتلا به SLE، rheumatoid arthritis و افراد سالم اعلام کردند که بیان miR-126 تنها در بیماران مبتلا به SLE مشاهده شد اما در مقابل ٤ mi-RNA شامل miR-21، miR-451، miR-223 و miR-16 در مبتلایان به SLE وجود داشت، اما در بیماران مبتلا به RA افزایش یافته بود و در مقابل miR-125a-3p، miR-155 و miR-146a یک روند کاهشی در بیماران مبتلا به SLE داشتند (۳۸). با توجه به اهمیت نفریت لوپوسی در بیماران مبتلا به لوپوس و عدم وجود نتایج قطعی در ارتباط با سطح میکروRNAها و فعالیت بیماری؛ هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی ارتباط سطح MicroRNA-125a و MicroRNA-146a ادرار بیماران با فعالیت بیماری و یافته‌های پاتولوژی در بیماران همراه با نفریت لوپوسی بود.

روش كار و مواد

بیماران:

در یک مطالعه توصیفی تحلیلی (Descriptive Analytical) ۳۰ نفر از بیماران مبتلا به لوپوس همراه با نفریت لوپوسی که به کلینیک دانشگاه علوم پزشکی تبریز مراجعه کرده بودند، و ۳۰ نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل، به صورت تصادفی آسان و نمونه‌گیری در دسترس انتخاب و وارد مطالعه شدند.

جهت تعیین حجم نمونه اطلاعات اولیه بر اساس مطالعات قبلی صورت گرفته، تعیین و با استفاده از نرم افزار محاسبه حجم نمونه G-power؛ حجم نمونه اولیه لازم برای مطالعه ۳۰ نفر انتخاب شد، که در نهایت ۳۰ بیمار لوپوس همراه با نفریت لوپوسی و ۳۰ نفر فرد سالم که از نظر سنی و جنسی با گروه بیماران یکسان‌سازی شده بودند، به صورت تصادفی آسان و نمونه‌گیری در دسترس انتخاب و وارد مطالعه شدند.

محل و مدت انجام مطالعه:

مکان انجام پژوهش، کلینک نفرولوژی و روماتولوژی بیمارستان آموزشی درمانی امام رضا دانشگاه علوم پزشکی تبریز، و نیز آزمایشگاه تخصصی ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بود.

مدت زمان انجام مطالعه به مدت ۱۸ ماه، از ابتدای بهمن ماه سال ۱۳۹٤ تا ابتدای مرداد ماه سال ۱۳۹٦ بود. پس از انجام مطالعه و جمع آوری اطلاعات اولیه، تجزیه و تحلیل داده ها انجام گرفت.

معیارهای ورود به مطالعه:

۱. ابتلا به لوپوس بر اساس معیارهای ACR و تایید پزشک روماتولوژیست مربوطه.
۲. ابتلا به نفریت لوپوسی بر اساس تایید فوق تخصص نفرولوژی و روماتولوژی.
۳. رضایت کتبی آگاهانه بیمار برای شرکت در مطالعه.

معیارهای خروج (عدم ورود) از مطالعه:

۱. بیماران لوپوسی دارای عفونت.
۲. بیماران لوپوسی همراه با سندرم آنتی فسفولیپید.
۳. بیماران لوپوسی همراه با سندرم overlap.
٤. بیماران لوپوسی درمان شده با لوپوس خاموش.
۵. عدم رضایت آگاهانه بیمار برای شرکت در مطالعه.

روش انجام مطالعه:

پس از تایید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و با در نظر گرفتن معیارهای ورود به مطالعه و خروج از آن و پس از شرح هدف از انجام مطالعه و نحوه انجام آن و اخذ رضایت‌نامه کتبی آگاهانه از بیماران، ۳۰ نفر از بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی و ۳۰ نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل، به صورت تصادفی آسان و نمونه‌گیری در دسترس انتخاب و وارد مطالعه شدند.

تمامی بیماران در ابتدا توسط پزشک فوق تخصص نفرولوژی و نیز پزشک فوق تخصص روماتولوژی تحت ارزیابی قرار گرفتند و اطلاعات دموگرافیک بیماران در چک لیست مخصوص مطالعه ثبت گردید. سپس بر اساس یافته‌های بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی در گروه مورد اندکس فعالیت بیماری بر اساس SLEDAI و اندکس Chronisity بیماران تعیین گردید.

پس از ثبت اطلاعات دموگرافیک افراد هر دو گروه مطالعه؛ از تمامی افراد نمونه ادراری جهت آنالیز از نظر بیان MicorRNA-125a و MicroRNA-146a اخذ گردید.

طریقه استخراج Micro-RNAها از نمونه ادرار مورد بررسی در بیماران:

نمونه‌های ادرار جمع آوری شده در ظروف استریل در ٤ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و مایع سوپرناتانت بیرون ریخته شد. استخراج total mRNA از پلت سلولی در لیز بافر صورت گرفت و به دنبال آن استخراج میکروRNA با توجه به دستورالعمل کیت از total mRNA صورت گرفت. در پایان کمیت و کیفیت miRNAهای

استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری در طیف ۲۸۰ و۲٦۰ نانومتر بررسی گردید. miRNAهای استخراج شده در میکروتیوب‌ها aliquot شده و در فریزر۸۰- درجه سانتی‌گراد برای اهداف بعدی نگه داری شد.

با استفاده از ۱ میکروگرم RNA واکنش رونویسی معکوس (RT) ست گردید. سنتز رشته اول cDNA در حضور بافر، پرایمرهای خاص، مخلوط dNTP (با dNTP) مهارگرRNAase، و آنزیم Reverse Transcriptase و در دستگاه Real-time بر طبق برنامه دمایی خاص آغاز گردید که بطور خلاصه عبارت است از: ۳۰ دقیقه در ۱٦ درجه، ۳۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه و نهایتا ٥ دقیقه در دمای ۸٥ درجه سانتی‌گراد. cDNA های سنتز شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگه داری گردید.

در ادامه با استفاده از روش qPCR نسخه‌های microRNA در خون سلول‌های سدیمنت ادرار بررسی و تعیین مقدار گردید. برای هر نمونه، واکنش Real Time-PCR به حجم ۱۰ میکرولیتر متشکل از آب و پرایمرهای (reverse and forward) مخصوص هر microRNA، سایبرگرین مستر میکس با سه تکرار و به صورت همزمان انجام گرفت و میانگین‌های به دست آمده برای هر microRNA محاسبه گردید (برنامه دقیق دمایی- زمانی دستگاه Real Time، باید مورد آزمایش قرار گیرد، تا برنامه مطلوب تعیین گردد). در نهایت نتایج حاصل برای نمونه‌ها با گروه کنترل مقایسه شد.

در تمامی مراحل مطالعه، ثبت موارد مورد بررسی انجام گرفت و متغیرهای مورد مطالعه جمع آوری و ثبت شدند. در نهایت پس از جمع آوری اطلاعات حاصله، داده ها وارد نرم افزار تحلیل آماری SPSS version 16 شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی:

مطالعه حاضر پس از ذکر هدف و نحوه انجام مطالعه به بیماران و افراد گروه کنترل و بیان این نکته که تمامی اطلاعات آن‌ها، به صورت محرمانه خواهد بود، و اطلاعات شخصی آنها در جایی ذکر نخواهد شد، و پس از تایید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و اخذ رضایت نامه کتبی آگاهانه از بیماران، انجام شد.

در تمام طول مطالعه هیچگونه مداخله تشخیصی و درمانی اضافی (جز بررسی بیان miR-125a و miR-146a) صورت نگرفت. همچنین هزینه بررسی بیان ژن miR-125a و miR-146a در افراد سالم و بیماران، از طرف مجری طرح و با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تامین شد و هیچگونه هزینه اضافی از بیماران و خانواده آن‌ها دریافت نشد.

موارد بررسی شده:

سن، جنس، بیان miR-125a و miR-146a در نمونه ادراری هر دو گروه مورد مطالعه، و نیز سطح کمپلمان‌های C_3 و C_4، ANA، Anti-ds-DNA، سطح کراتینین، پروتئین‌اوری ۲٤ ساعته، ESR، Stage بیماری، SLEDAI و اندکس Chronisity در بیماران گروه مورد ثبت شد و به عنوان اطلاعات اولیه، جمع آوری شد. بر اساس اطلاعات فوق، اهداف اصلی و اختصاصی مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند (رجوع به مقدمه).

آنالیز آماری (**Statistical Analysis**):

برنامه آماری بکار رفته SPSS™ نسخه ۱٦ بود.

اطلاعات به دست آمده بصورت میانگین± انحراف معیار و فراوانی و درصد بیان شد.

توزیع نرمال داده ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov ارزیابی شد.

برای مقایسه متغیرهای کیفی از آزمون آماری chi square و برای مقایسه متغیرهای کمی در بین دو گروه مطالعه Independent t test یا Mann Whitney U test مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای ارزیابی ارتباط بین متغیرها از Pearson Correlation استفاده شد و برای تعیین Cut off point و حساسیت و اختصاصیت از منحنی ROC استفاه شد.

در تمامی موارد مورد مطالعه، نتایج در صورت دارا بودن $P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار شناخته شدند.

یافته ها

اطلاعات کلی

جنسیت:

در گروه مورد ۷ نفر (۲۳/۳٪) از بیماران مرد، و ۲۳ نفر (۷٦/۷٪) زن بودند. در گروه کنترل ۹ نفر (۳۰/۰٪) مرد، و ۲۱ نفر (۷۰/۰٪) زن بودند. دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری از لحاظ جنسیت با یکدیگر نداشتند (P=0.890).

سن:

میانگین سنی بیماران در گروه مورد ۸/۷۹±۳۲/٦۱ سال و افراد گروه کنترل ۷/۲٤±۳۰/٤٤ سال بود. دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری از لحاظ میانگین سنی با یکدیگر نداشتند (P=0.393).

بیان miR-125a:

میانگین سطح miR-125a در ادرار بیماران گروه مورد ۱/۳۹±۳٦/٦۸ و در گروه کنترل ۱/٦٤±۳۳/۷۹ بود. سطح ادراری miR-125a در بیماران گروه مورد به میزان معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (P=0.001).

بیان miR-146a:

میانگین سطح miR-146a در ادرار بیماران گروه مورد ۲/۳۳±۳٤/۹٤ و در گروه کنترل ۱/۷۵±۳۱/۸۵ بود. سطح ادراری miR-146a در گروه مورد به میزان معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (P=0.001).

ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی گروه مورد:

جدول ١-٤. نشان دهنده ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی می‌باشد.

جدول ١-٤. ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی

میزان متغیر	mean±SD	Min	Max
C_3 (mg/dL)	٥٤/١١±٣٤/١٦	١٢	١١٠
C_4 (mg/dL)	٢٧/٣٨±١٩/٧٢	٦	٨٩
ANA	٥/٦٧±٨/٧٩	٠/٣	٥٦/١
anti-dsDNA	٤١/٦٣±٣٠/٦٠	٤	٩٤
Cr (mg/dL)	١/٢٣±٠/٣٦	٠/٧٩	٢/١
24 Hr urine pro (mg)	١٢٨٣/٤١±١٣٠٣/٥٨	٥٩	٥١٠٠
ESR	٢٥/٠٤±١٤/١٣	٧	٥٦
Stage	٣/٩٦±٠/٧٧	٣	٥
Chronisity Index	٤/٧٦±٢/٠٤	٢	٨
SLEDAI	١٠/٠٧±٣/٤١	٤	١٦

ارتباط سطح ادراری miR-125a و miR-146a با ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی:

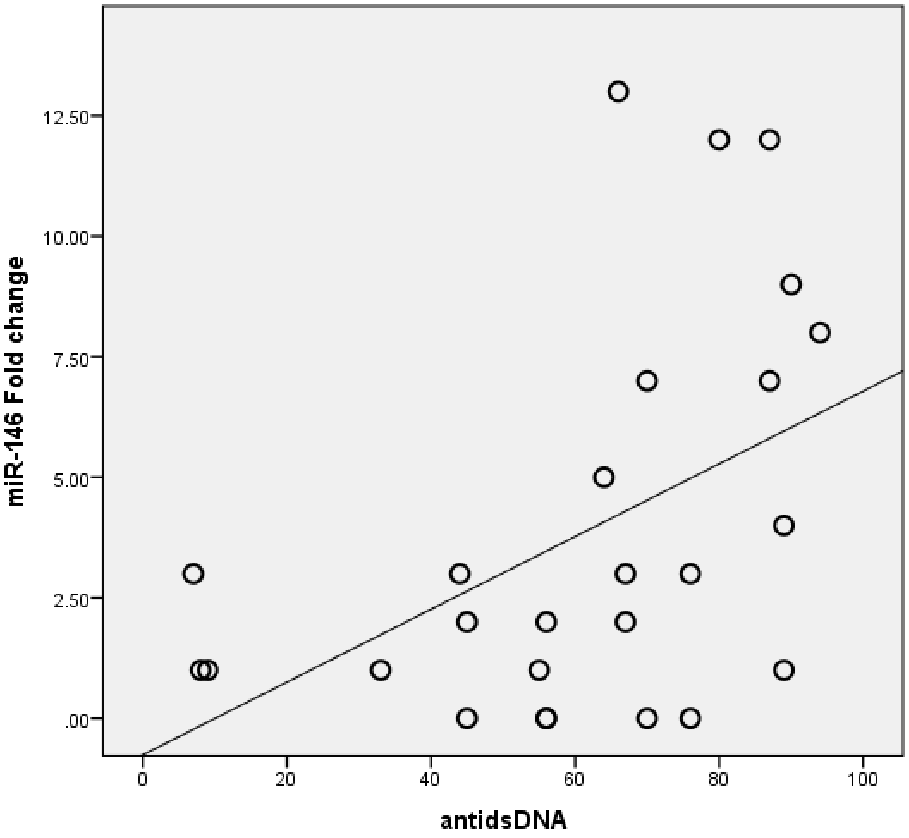
جدول ١-٤. نشان دهنده ارتباط بیان miR-125a و miR-146a با ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی می‌باشد.

جدول ۲–٤. ارتباط بیان ژن با ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی

ژن متغیر	miR-125a	miR-146a
C_3	r=-0.015 P=0.940	r=-0.195 P=0.341
C_4	r=0.097 P=0.638	r=-0.118 P=0.566
ANA	r=-0.075 P=0.720	r=0.088 P=0.678
anti-dsDNA	r=0.224 P=0.272	*r=0.475* *P=0.014*
Cr	r=0.157 P=0.442	r=0.089 P=0.665
24 Hr urine pro	r=-0.035 P=0.864	*r=-0.389* *P=0.049*
ESR	r=0.118 P=0.565	r=0.205 P=0.316
Stage	r=-0.172 P=0.421	r=-0.043 P=0.843
Chronisity Index	r=0.290 P=0.200	r=0.176 P=0.390
SLEDAI	r=-0.244 P=0.230	r=-0.175 P=0.393

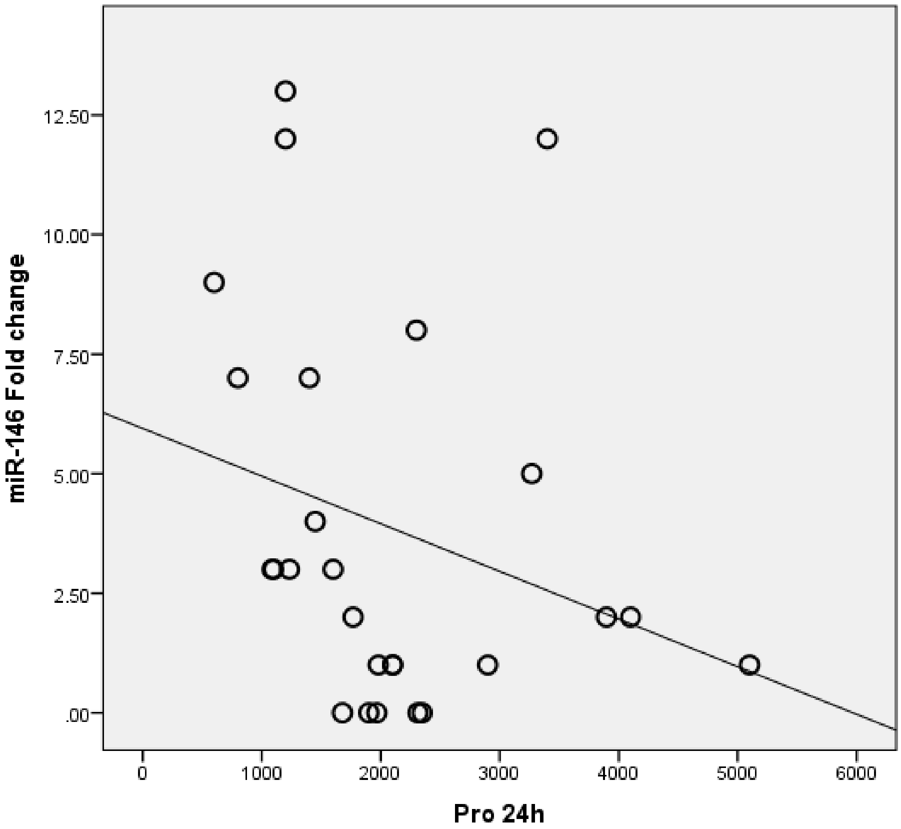
بر اساس جدول ۲-٤، میزان بیان miR-146a با میزان anti-dsDNA ارتباط مستقیم معنی‌دار آماری (r=0.475، P=0.014)، و با میزان پروتئین اوری ۲٤ ساعته ارتباط معکوس معنی‌دار آماری (r=-0.389، P=0.049) داشت. ارتباط معنی‌دار آماری بین بیان ژن‌های مورد بررسی با سایر متغیرهای بالینی و آزمایشگاهی مشاهده نشد.

نمودار ۱-٤، نشان دهنده ارتباط میزان بیان miR-146a با میزان anti-dsDNA در بیماران مورد مطالعه می‌باشد.



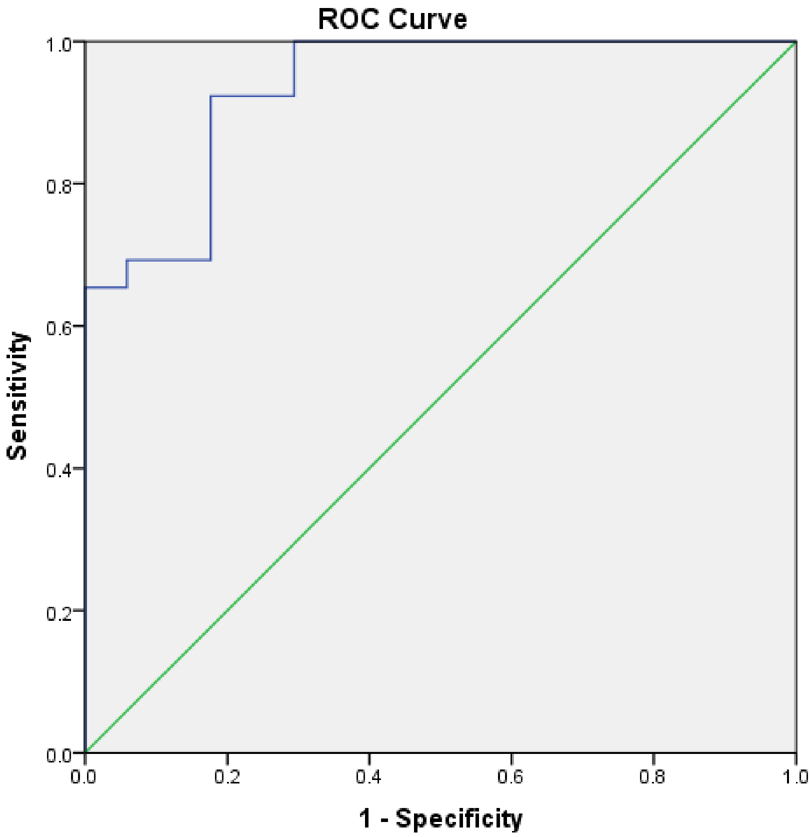
نمودار ۱-٤. ارتباط میزان بیان miR-146a با میزان anti-dsDNA

نمودار ۲-٤، نشان دهنده ارتباط میزان بیان miR-146a با میزان پروتئین اوری ٢٤ ساعته در بیماران مورد مطالعه می‌باشد.



نمودار ۲-٤. ارتباط میزان بیان miR-146a با میزان پروتئین اوری ٢٤ ساعته

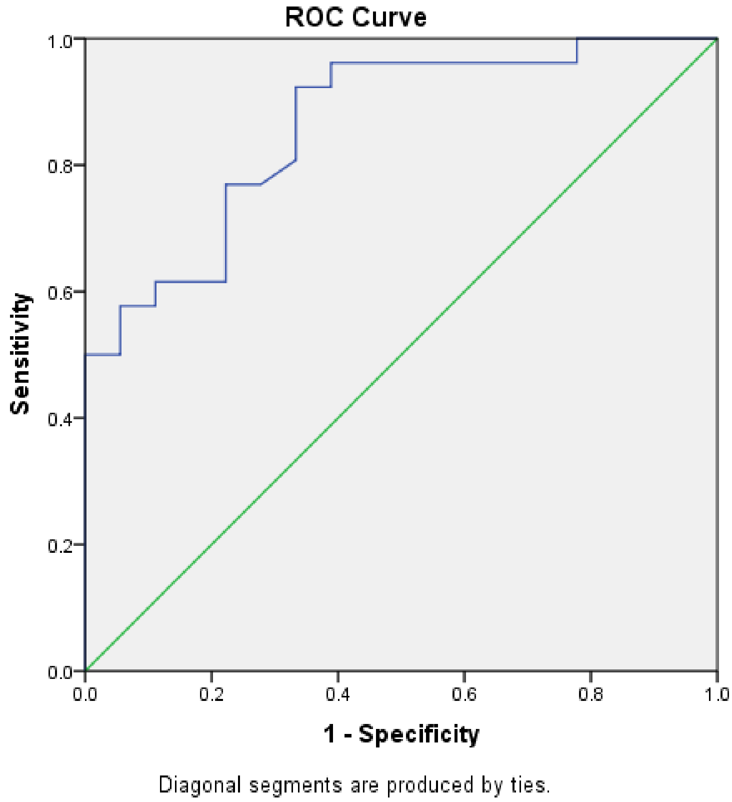
نمودار ۳-٤، نشان دهنده منحنی ROC میزان بیان miR-125a در تشخیص بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی می‌باشد.



نمودار ۳–٤. منحنی ROC بیان miR-125a در تشخیص بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی

بر اساس نمودار فوق، نقطه برش (cut off point) بیان ژن miR-125a در تعیین ابتلا به نفریت لوپوسی؛ ۳۵/۱٤ تعیین شد، که در مقادیر بزرگتر مساوی این مقدار؛ میزان حساسیت این تست ۹۲/۳٪ و ویژگی آن ۸۲/٤٪ بود. همچنین مساحت زیر منحنی نمودار، ۰/۹۳٤ محاسبه شد.

نمودار ٤–٤، نشان دهنده منحنی ROC میزان بیان miR-146a در تشخیص بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی می‌باشد.



نمودار ٤-٤. منحنی ROC بیان miR-146a در تشخیص بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی

بر اساس نمودار فوق، نقطه برش (cut off point) بیان ژن miR-146a در تعیین ابتلا به نفریت لوپوسی؛ ۳۲/۱۵ تعیین شد، که در مقادیر بزرگتر مساوی این مقدار؛ میزان حساسیت این تست ۹۲/۳٪ و ویژگی آن ٦٦/٧٪ بود. همچنین مساحت زیر منحنی نمودار، ۰/٨٦٢ محاسبه شد.

بحث

لوپوس یک بیماری التهابی و چند سیستمی با علت ناشناخته می‌باشد که بسیاری از ارگان‌های بدن را درگیر می‌کند، که در آن آنتی‌بادی‌های خودی و کمپلکس ایمنی سبب آسیب بافتی و سلولی می‌شود (۴۰). این بیماری عمدتاً افراد جوان و به ویژه زنان را مبتلا می‌کند؛ که در بسیاری از موارد در سیر بیماری، کلیه‌ها نیز درگیر می‌شوند که جزو علائم شدید بیماری محسوب می‌شود و نفریت لوپوسی برای اولین بار توسط ویلیام اوسلر شناخته شد (۴۱، ۴۲).

تخمین زده می‌شود که حدود یک سوم از بیماران مبتلا به لوپوس در طی بیماری خود به نفریت لوپوسی مبتلا می‌شوند و در مطالعات مختلف میزان آن ۲۹ تا ۵٤ درصد بیان شده است (٤۳). شیوع لوپوس در ایران نیز همانند سایر کشورها به طور عمده زنان را مبتلا می‌نماید (٤۳، ٤٤). با وجود ناشناخته بودن اتیولوژی اصلی این بیماری، مطالعات انجام شده؛ عوامل گوناگونی از جمله زمینه ژنتیکی و عوامل محیطی به خصوص ویروس‌ها را در بروز بیماری موثر ذکر کرده‌اند (٤۵).

افزایش اطلاعات در زمینه رفتار سلولی، مولکولی، و ژنتیک بیولوژیکال بیماری‌ها تاثیر مهمی در تعیین روش‌های تشخیصی و استراتژی‌های درمانی دارد (٤٦). میکروRNA یک رشته non-coding single-strande می‌باشد، که مولکول‌های اندوژن RNA به میزان تقریبی ۲۱ تا ۲۵ ریبونوکلئوتید در طول خود دارد. میکروRNA ها در انواع پردازش‌های بیولوژیکی مهم می‌باشند، که شامل پیشرفت، تمایز سلولی، پرولیفراسیون، آپوپتوز، ترشح هورمونی، تشکیل تومور، مقاومت دارویی، و ... می‌باشد (٤۷).

افزایش بیان RANTES با افزایش پایدار یا راجعه التهاب بدلیل انتقال سلول‌های T به بافت ملتهب همراه است. کاهش بیان Micro-RNA-125a در سلول‌های T بیماران مبتلا به لوپوس، منجر به افزایش بیان RNATES در شده و مهاجرت سلول های T را در بافت ملتهب افزایش می‌دهد (۹).

با توجه به توسعه دانش مولکولی و نقش Micro-RNAها در بیماری لوپوس و ارتباط آن با شدت التهاب و تغییرات بیان Micro-RNAها با درمان‌های تجویزی، مطالعات صورت گرفته پیشنهاد کرده‌اند که از ارزیابی سطح بیان Micro-RNAها می‌توان در ارزیابی شدت بیماری و مانیتورینگ بیماران مبتلا به لوپوس استفاده کرد و در درمان این بیماری تحولات اساسی ایجاد کرد (٤٨). در ارتباط با استفاده از بیومارکرهای Micro-RNAها علاوه بر غیر تهاجمی بودن، دسترسی به متدهای بسیار حساس PCR، و توانایی تشخیص زودهنگام بیماری لوپوس و سایر بیماری‌های روماتولوژیک قبل از بروز علائم بالینی و یافته‌های پاتولوژیک از جمله مزایای استفاده از این روش‌های مولکولی می‌باشد (٤٩).

با توجه به اینکه SLE یک بیماری نسبتا شایع همراه با مورتالیتی و موربیدیتی بالا می‌باشد و نیز مطالعات انجام شده به نقش بیان ژن‌های Micro-RNA-125a و Micro-RNA-146a در بروز لوپوس اشاره کرده‌اند، اما در ارتباط با سطوح ادراری این Micro-RNAها نتایج قطعی گزارش نشده است، و همچنین تاثیر محیط جغرافیایی و نژاد در پراکندگی ژنی در میان جمعیت و با در نظر گرفتن اینکه منطقه ما، که اغلب مردمان آن آذری می‌باشند، جزو مناطق همراه با بروز بالای بیماری‌های روماتولوژیک و نیز لوپوس می‌باشد؛ بنابراین در مطالعه حاضر

به بررسی سطح ادراری Micro-RNA-125a و Micro-RNA-146a در بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی و مقایسه آن با گروه کنترل و ارزیابی ارتباط آن با فعالیت بیماری و یافته‌های پاتولوژی و آزمایشگاهی پرداختیم. بر اساس نتایج مطالعه حاضر سطح ادراری هر دو Micro-RNA-125a و 146a- در بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی به میزان معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. در ارزیابی ارتباط سطح Micro-RNAها با یافته‌های بالینی، آزمایشگاهی و پاتولوژی، ارتباط معنی‌داری بین سطح Micro-RNA-146a و سطح anti-ds-DNA مشاهده شد و با میزان پروتئین اوری ۲٤ ساعته ارتباط معکوس معنی‌دار داشت، اما با سایر پارامترهای مورد مطالعه از جمله SLEDAI و Chronisity Index ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

در مطالعه Abulaban و همکاران در سال ۲۰۱٦ میلادی سطح Micro-RNAهای 125a، 127، 146a، 150، و 155 در سدیمان ادراری و سوپرناتانت ١٤ کودک با نفریت فعال لوپوسی، ۱۰ کودک با لوپوس فعال بدون درگیری کلیوی، و ۱۰ نفر گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که تمامی Micro-RNAهای مورد مطالعه در سوپرناتانت ادراری (نه در سدیمان) با پانل نفریت لوپوسی ارتباط معنی‌دار داشتند. همچنین Micro-RNAهای 125a، 127، و 146a با سطح C_3 و سطح anti-ds-DNA ارتباط معنی‌دار آماری داشتند و در نهایت miRNA146a تنها با شاخه کلیوی SLEDAI ارتباط معنی‌دار داشت. تفاوت معنی‌داری در سطح ادراری Micro-RNAهای مورد بررسی در سه گروه مورد مطالعه مشاهده نشد. در نهایت این مطالعه بیان کرد که Micro-RNAهای بدون سلول سوپرناتانت ادراری با پانل نفریت لوپوسی مرتبط می‌باشند. این Micro-RNAها می‌توانند به

عنوان یافته‌های مکمل در کنار پانل نفریت لوپوسی مورد استفاده قرار گیرند، اما نمی‌توانند جایگزین پانل نفریت لوپوسی (neutrophil gelatinase associated lipocalin، monocyte chemotactic protein1، transferrin، و beta-trace protein) در تعیین فعالیت نفریت لوپوسی گردند (۵۰). نتایج مطالعه حاضر تا حدودی با مطالعه Abulaban و همکاران مطابقت داشت. در مطالعه حاضر نیز سطح سوپرناتانت ادراری miRNA146a با سطح anti-ds-DNA ارتباط معنی‌دار آماری داشت اما ارتباط معنی‌داری با SLEDAI مشاهده نشد. در مطالعه حاضر سطح ادراری هر دو Micro-RNA در بیماران به میزان معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود.

در مطالعه دیگری Dai و همکاران، نمونه خون محیطی ۲۳ بیمار مبتلا به لوپوس، ۱۰ بیمار مبتلا به ITP و ۱۰ فرد سالم را مورد ارزیابی قرار دادند. بررسی miRNA در نمونه خون محیطی این افراد نشان داد که بیان ١٦ عدد از miRNA در بیماران مبتلا به لوپوس تفاوت معنی‌دار داشت. در نهایت این مطالعه بیان کرد که miRNA پتانسیل استفاده به عنوان بیومارکر تشخیصی را دارند و به عنوان فاکتورهای احتمالی دخیل در پاتوژنز لوپوس مطرح می‌باشند (۵۱). همچنین Dai و همکاران در مطالعه دیگری بیوپسی کلیوی حاصل از ۵ بیمار مبتلا به نفریت لوپوسی کلاس II و ۳ فرد سالم مورد مقایسه قرار دادند. کیت تشخیصی مورد استفاده در این مطالعه، بیان متفاوت miRNA را در ٦٦ مورد نشان داد. نتایج حاصل از مطالعه با استفاده از PCR کمی مورد تایید قرار گرفت. این مطالعه نیز همانند مطالعه قبلی Dai و همکاران بیان کرد که miRNAها پتانسیل استفاده به عنوان بیومارکر تشخیصی را دارند (٤). بر اساس نتایج مطالعه حاضر نیز سطح هر دو miRNA؛ 125a- و 146a- در سوپرناتانت

ادراری بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی به میزان معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر نیز همانند مطالعه Dai و همکاران می‌توان پیشنهاد کرد که از این دو miRNA موجود در ادرار نیز می‌توان به عنوان بیومارکر تشخیصی غیر تهاجمی در تشخیص نفریت لوپوسی استفاده کرد. در مطالعه حاضر cut off point سطح ادراری ژن miR-125a در تعیین ابتلا به نفریت لوپوسی؛ ۳۵/۱٤ تعیین شد، که میزان حساسیت این تست ۹۲/۳٪ و ویژگی آن ۸۲/٤٪ بود. همچنین cut off point سطح ادراری ژن miR-146a در تعیین ابتلا به نفریت لوپوسی؛ ۳۲/۱۵ تعیین شد، که حساسیت ۹۲/۳٪ و ویژگی ٦٦/۷٪ داشت.

در مطالعه دیگری، Stagakis و همکاران نیز بیان کردند که micro-RNA یک بیومارکر بالقوه در بیماران مبتلا به SLE می‌باشد و با فعالیت بیماری ارتباط دارد (۳٦). در مطالعه دیگری که توسط Teruel و همکاران در دانشگاه Mureiu اسپانیا انجام گرفت؛ با بررسی سطح و میزان بروز microRNAها در بیماران مبتلا به SLE بیان کردند که کاهش سطح miR-19b و miR-20a در بیماران مبتلا به SLE و آنتی فسفولیپید سندرم وجود دارد (۵۲).

در مطالعه دیگری که توسط Wang و همکاران بر روی ٤۰ بیمار مبتلا به لوپوس و ۳۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل صورت گرفت، سطوح سرمی و ادراری miR-146a و miR-155 مورد مقایسه قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه، سطح سرمی هر دو miR در بیماران کمتر از گروه کنترل بود، اما سطح ادراری miR-146a در بیماران مبتلا به لوپوس به میزان معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. در این مطالعه سطح سرمی miR-146a با

پروتئین اوری و فعالیت بیماری ارتباط معنی‌دار معکوس از نظر آماری داشت. پس از گذشت ٦ ماه درمان توسط کلسیتریول، سطح سرمی miR-146a در گروه بیماران به میزان معنی‌داری افزایش پیدا کرد (۵۳). بر اساس نتایج مطالعه حاضر نیز همانند مطالعه Wang و همکاران؛ سطح ادراری miR-146a در بیماران مبتلا به لوپوس به میزان معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود، همچنین با میزان پروتئین اوری بیماران ارتباط معنی‌دار معکوس از نظر آماری داشت، اما ارتباط معنی‌داری با میزان فعالیت بیماری مشاهده نشد.

در مطالعه دیگری که توسط Hashad و همکاران در دانشگاه اسکندریه مصر در سال ۲۰۱۲ میلادی انجام گرفت؛ با بررسی میزان بیان microRNA-146a در بیماران مبتلا به لوپوس بیان کردند که میزان بیان microRNA-146a در بیماران مبتلا به SLE به صورت معنی‌داری کمتر از گروه کنترل سالم بود، و این میزان در بیماران مبتلا به SLE با درگیری کلیه کمتر بوده و همچنین ارتباط معنی‌دار معکوسی بین میزان بیان microRNA-146a با سطح IFN-α، anti ds-DNA، و میزان activity بیماری وجود داشت (٥٤). در مطالعه حاضر نیز سطح ادراری microRNA-146a با anti ds-DNA بیماران ارتباط معنی‌دار آماری داشت. با در نظر گرفتن این نکته که بر اساس اغلب مطالعات صورت گرفته در زمینه بیان miR-146a در بیماران مبتلا به لوپوس سطوح سرمی این بیومارکر در این بیماران کاهش، و سطح ادراری آن افزایش می‌یابد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ارتباط مستقیم آماری بین سطح ادراری miR-146a با تیتراژ anti ds-DNA در مطالعه حاضر، با نتایج مطالعه Hashad و همکاران همراستا بود.

در حالت کلی، بر اساس نتایج مطالعه حاضر و همچنین بر اساس اغلب مطالعات صورت گرفته در این زمینه؛ سطح سرمی و ادراری انواع MicroRNA در بیماران مبتلا لوپوس و نیز نفریت لوپوسی دستخوش تغییراتی می‌گردد که با ارزیابی سطوح آن می‌توان در تشخیص زودهنگام بیماری و نیز ارزیابی پاسخ به درمان و مانیتورینگ بیماران استفاده کرد.

در نهایت، با توجه به اهمیت مطالب بیان شده در ارتباط با نفریت لوپوسی و نیاز به کاهش هزینه‌ها و مورتالیته بیماران با تشخیص زودهنگام بیماری، و نیز اهمیت بالینی این موضوع و نبود نتایج قطعی اثبات شده در کتب مرجع پزشکی، انجام مطالعات تکمیلی در این زمینه، جهت تصمیم‌گیری بهتر، امری ضروری می‌باشد (رجوع به پیشنهادات).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، در بررسی سطح ادراری ژن‌های miR-125a و miR-146a در بیماران مبتلا نفریت لوپوسی و مقایسه آن با افراد سالم گروه کنترل، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح ادراری هر دو -miR در بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی به میزان معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر سطح ادراری miR-146a با سطح anti-ds-DNA ارتباط مستقیم آماری و با میزان پروتئین اوری ۲۴ ساعته ارتباط معکوس آماری داشت. در مطالعه حاضر cut off point سطح ادراری ژن miR-125a در تعیین ابتلا به نفریت لوپوسی؛ ۳۵/۱۴ تعیین شد، که میزان حساسیت این تست ۹۲/۳٪ و ویژگی آن ۸۲/٤٪ بود. همچنین cut off point سطح ادراری ژن miR-146a در تعیین ابتلا به نفریت لوپوسی؛ ۳۲/۱۵ تعیین شد، که حساسیت آن نیز ۹۲/۳٪ و ویژگی آن ٦٦/٧٪ بود. نتایج مطالعه حاضر بیانگر این موضوع می‌باشد که بررسی سطح ادراری miR-125a و miR-146a در تشخیص زودهنگام نفریت لوپوسی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد، و به این روش می‌توان پروگنوز بیماران را به میزان چشمگیری افزایش داد و با بکارگیری از روش‌های ژن‌درمانی روش‌های جدیدی را در درمان بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی مورد استفاده قرار داد.

پیشنهادات

مطالعه اخیر نشان داد که سطح ادراری miR-125a و miR-146a در بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی به میزان معنی‌داری بیشتر از افراد گروه کنترل بود. با توجه به توسعه استفاده از روش‌های مولکولی و سلولی در تشخیص و درمان بیماران مبتلا به انواع بیماری‌ها مخصوصا بیماری‌های اتوایمیون؛ استفاده از سطح ادراری و سرمی miR-125a و miR-146a می‌تواند در تشخیص زودهنگام بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به اینکه مطالعات انجام شده در خصوص سطح ادراری miR-125a و miR-146a و سایر microRNAها و ارتباط آن با ابتلا به نفریت لوپوسی به نتایج قطعی اشاره نکرده‌اند؛ و کتب مرجع پزشکی نیز به بررسی این موضوع نپرداخته‌اند؛ و نیز با در نظر گرفتن اهمیت بالینی تشخیص زودهنگام بیماران و استفاده از روش‌های ژن‌درمانی در بیماران مبتلا به نفریت لوپوسی؛ پیشنهاد می‌شود که جهت اجرای این روش‌ها به صورت گایدلاین درمانی در تشخیص بیماران مبتلا نفریت لوپوسی؛ مطالعات تکمیلی در این زمینه انجام گیرد.

همچنین با توجه به اهمیت بالینی موضوع، جهت رسیدن به نتایج قطعی‌تر، انجام مطالعات مشابه در این زمینه با در نظر گرفتن سایر عوامل نظیر مدت زمان ابتلا به لوپوس، سابقه فامیلی، نژاد بیماران، محل جغرافیایی، و ... و نیز انجام مطالعات مروری در این زمینه توصیه می‌شود.

منابع

REFERENCES

1- Fauci, A. S. (2008). *Harrison's principles of internal medicine* (Vol. 2, pp. 1612-1615). New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division.

2- Goldman, L., & Ausiello, D. A. (Eds.). (2008). *Cecil medicine* (Vol. 702). Philadelphia^ ePA PA: Saunders Elsevier.

3- Freedman, B. I., et al. (2014). End-Stage Renal Disease in African Americans With Lupus Nephritis Is Associated With APOL1. *Arthritis & Rheumatology*, *66*(2), 390-396.

4- Dai, Y., Sui, W., Lan, H., Yan, Q., Huang, H., & Huang, Y. (2009). Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatology international*, *29*(7), 749-754.

5- Lindsay, M. A. (2008). microRNAs and the immune response. *Trends in immunology*, *29*(7), 343-351.

6- Dai, R., & Ahmed, S. A. (2011). MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational Research*, *157*(4), 163-179.

7- Baltimore, D., Boldin, M. P., O'connell, R. M., Rao, D. S., & Taganov, K. D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology*, *9*(8), 839-845.

8- Lu, L. F., et al. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, *142*(6), 914-929.

9- Potenza, N., & Russo, A. (2013). Biogenesis, evolution and functional targets of microRNA-125a. *Molecular genetics and genomics*, *288*(9), 381-389.

10- Junker, A., et al. (2009). MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain*, *132*(12), 3342-3352.

11- Carissimi, C., Fulci, V., & Macino, G. (2009). MicroRNAs: novel regulators of immunity. *Autoimmunity reviews*, *8*(6), 520-524.

12- Guerau-de-Arellano, M., Alder, H., Ozer, H. G., Lovett-Racke, A., & Racke, M. K. (2012). miRNA profiling for biomarker discovery in multiple sclerosis: from microarray to deep sequencing. *Journal of neuroimmunology*, *248*(1), 32-39.

13- Martinelli-Boneschi, F., et al. (2012). MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. *Neuroscience letters*, *508*(1), 4-8.

14- Benes, V., & Castoldi, M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*, *50*(4), 244-249.

15- Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine*, *60*, 167-179.

16- Garofalo, M., Condorelli, G., & Croce, C. M. (2008). MicroRNAs in diseases and drug response. *Current opinion in pharmacology*, *8*(5), 661-667.

17- Pauley, K. M., & Chan, E. K. (2008). MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1143*(1), 226-239.

18- Taganov, K. D., Boldin, M. P., & Baltimore, D. (2007). MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity*, *26*(2), 133-137.

19- Fenoglio, C., et al. (2011). Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience letters*, *504*(1), 9-12.

20- Junker, A., Hohlfeld, R., & Meinl, E. (2011). The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, *7*(1), 56-59.

21- Eis, P. S., et al. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(10), 3627-3632.

22- Bandiera, S., Hatem, E., Lyonnet, S., & Henrion-Caude, A. (2010). microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes. *Clinical genetics*, *77*(4), 306-313.

23- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic acids research*, *32*(16), 4776-4785.

24- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*, *136*(2), 215-233.

25- Pauley, K. M., Cha, S., & Chan, E. K. (2009). MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*, *32*(3), 189-194.

26- Bi, Y., Liu, G., & Yang, R. (2009). MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *Journal of cellular physiology*, *218*(3), 467-472.

27- O'connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, *10*(2), 111.

28- Błach-Olszewska, Z. (2005). Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *53*(3), 245-253.

29- Sioud, M. (2007). RNA interference and innate immunity. *Advanced drug delivery reviews*, *59*(2), 153-163.

30- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2017). Immunobiology: the immune system in health and disease. 2005. *New York: Garland Science*, *6*.

31- Lu, L. F., & Liston, A. (2009). MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*, *127*(3), 291-298.

32- Rodriguez, A., et al. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, *316*(5824), 608-611.

33- Magilnick, N., et al. (2017). miR-146a–Traf6 regulatory axis controls autoimmunity and myelopoiesis, but is dispensable for hematopoietic stem cell homeostasis and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201706833.

34- Goodnow, C. C. (2007). Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell, 130*(1), 25-35.

35- Xiao, C., et al. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with elevated miR-17− 92 expression in lymphocytes. *Nature immunology*, *9*(4), 405.

36- Zibert, J. R., Løvendorf, M. B., Litman, T., Olsen, J., Kaczkowski, B., & Skov, L. (2010). MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *Journal of dermatological science*, *58*(3), 177-185.

37- Carlsen, A. L., et al. (2013). Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, *65*(5), 1324-1334.

38- Wang, H., Peng, W., Ouyang, X., Li, W., & Dai, Y. (2012). Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Translational Research*, *160*(3), 198-206.

39- Stagakis, E., et al. (2011). Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Annals of the rheumatic diseases*, *70*(8), 1496-1506.

40- Bastian, H. M., et al. (2002). Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. *Lupus*, *11*(3), 152-160.

41- Badawi, A. I., El-Hamid, A. M. A., Mohamed, N. K., Darwish, E. M., Wassef, M., & Elfirgani, H. (2016). Serum tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and leptin as biomarkers of accelerated atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *The Egyptian Rheumatologist*.

42- Plantinga, L., et al. (2016). Incidence of End-Stage Renal Disease Among Newly Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus Patients: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis care & research*, *68*(3), 357-365.

43- Weening, J. J., et al. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney international*, *65*(2), 521-530.

44- Banchereau, J., & Pascual, V. (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity*, *25*(3), 383-392.

45- Petri, M., et al. (2012). Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, *64*(8), 2677-2686.

46- Cao, X. (2016). Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(1), 35.

47- Lakshmipathy, U., & Hart, R. P. (2008). Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem cells*, *26*(2), 356-363.

48- Te, J. L., et al. (2010). Identification of unique microRNA signature associated with lupus nephritis. *PloS one*, *5*(5), e10344.

49- Papp, G., et al. (2017). AB0137 Alterations in microrna expression profiles in primary sjÖgren9s syndrome and systemic lupus erythematosus.

50- Abulaban, K. et al. (2016). Relationship of cell-free urine MicroRNA with lupus nephritis in children. *Pediatric Rheumatology*, *14*(1), 4.

51- Dai, Y., et al. (2007). Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, *16*(12), 939-946.

52- Teruel, R., et al. (2011). Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *9*(10), 1985-1992.

53- Wang, G., et al. (2010). Serum and urinary cell–free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, *37*(12), 2516-2522.

54- Hashad, D. I., Abdelmagid, M. H., & Elsherif, S. H. (2012). microRNA146a Expression in Lupus Patients With and Without Renal Complications. *Journal of clinical laboratory analysis*, *26*(1), 35-40.

English Abstract

Evaluation Correlation of MicorRNA-125a and MicroRNA-146a with Disease Activity and Pathological Findings in Patients with Lupus Nephritis

Hengameh Jamshidi, Sima Abedi Azar, Mohammad Reza Jafari Nakhjavani.

Department of Internal Medicine, Imam Reza Hospital, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences.

Background:

Lupus nephritis (LN) is one of relatively common complication of lupus all over the world and is one of major problem of health care system. Role of genes were demonstrated in incidence of various autoimmune diseases. Some studies have mentioned the role of miR-125a & miR-146a gene in incidence of SLE. The aim of present study was to evaluate correlation of urinary level of MicorRNA-125a & MicroRNA-146a with disease activity and pathological findings in patients with LN.

Methods & Materials:

In a descriptive analytical study, 30 patients with LN who referred to Clinic of Imam Reza Educational Medical Center of Tabriz University of Medical Sciences for diagnostic & therapeutic procedures and 30 healthy individuals, were included the study. After RNA extraction, urinary level of MicorRNA-125a & MicroRNA-146a was determined using quantitative RT PCR in both groups. Age, sex, disease activity, and laboratory findings of patients were evaluated.

Results:

The mean urinary level of miR-125a & miR-146a in the case group were 36.68±1.39 & 34.94±2.33, and in the control group were 33.89±1.64 & 31.85±1.75 respectively. Urinary levels of miR-125a (P=0.001) and miR-146a (P=0.001) were significantly higher in the patient group than in the control group. The urinary level of miR-146a was significantly correlated with the level of anti-ds-DNA (r =0.475, P=0.014), and a there was a significant reverse correlation with 24-hour proteinuria (r=-0.389, P=0.049).

Conclusion:

Based on findings of present study, miR-125a & miR-146a gene may be involved in the pathogenesis and development of LN and have the potential to be used as diagnostic and therapeutic marker in LN.

Keywords: *Lupus Nephritis, Disease Activity, miR-125a, miR-146a.*

Tabriz University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

A Thesis Submitted for Sub-Specialty Degree in Nephrology

Evaluation Correlation of MicorRNA-125a and MicroRNA-146a with Disease Activity and Pathological Findings in Patients with Lupus Nephritis

Hengameh Jamshidi M.D.

Supervisors:

Sima Abedi Azar M.D.

Mohammad Reza Jafari Nakhjavani M.D.

October 2017

Thesis No: