

## تغییرات سطح بیان miR-199a و miR-196b در اهداکنندگان مبتلا به هیپاتیت C فاقد علائم

مریم محمدپور<sup>۱</sup>، زهره شریفی<sup>۲</sup>، علی عرب خزانلی<sup>۳</sup>، فائزه قاسمی<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

ویروس هیپاتیت C، یکی از عوامل اصلی عفونت کبدی می‌باشد که در مراحل اولیه معمولاً علائمی ندارد. مطالعه‌های تغییرات سطح بیان میکرو RNAها در بیماری‌های مختلف مانند هیپاتیت نشان داده شده است. به طوری که miR-199a و miR-196b بر روی ویروس هیپاتیت C اثر مهاری دارند. در مطالعه اخیر به بررسی سطح بیان miR-199a و miR-196b در نمونه سرم اهداکنندگان خون آلوده به هیپاتیت C فاقد علائم در مقایسه با نمونه سرم اهداکنندگان خون سالم، پرداخته شد تا بر اساس نتایج آن اهمیت میکرو RNAها در مراحل مختلف عفونت هیپاتیت C، مورد ارزیابی قرار گیرد.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مورد - شاهدی، ابتدا استخراج Total RNA از ۱۰۶ نمونه سرم اهداکنندگان خون سالم (گروه شاهد) و ۱۰۶ نمونه سرم اهداکنندگان خون آلوده به هیپاتیت C فاقد علائم (گروه مورد) انجام شد. پس از ساخت cDNA، سطح بیان miR-199a و miR-196b به وسیله سایبرگرین PCR اندازه‌گیری گردید و نتایج، توسط نرم‌افزار REST ۲۰۰۹ تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

سطح بیان miR-196b در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود ( $p < 0/001$ ). اختلاف معناداری در سطح بیان miR-199a بین دو گروه دیده نشد.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به کمتر بودن سطح بیان miR-196b و عدم اختلاف معنادار miR-199a در گروه مورد نسبت به گروه شاهد، مطالعه‌های بیشتر در خصوص نقش miR-196b در این بیماری را، می‌توان حائز اهمیت دانست.

**کلمات کلیدی:** هیپاتیت C، اهداکنندگان خون، میکرو RNAها

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۷

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD ویروس‌شناسی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- PhD اپیدمیولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD بیوتکنولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

**مقدمه**

ویروس هپاتیت C متعلق به خانواده فلاوی ویریده و جنس هپاسی ویروس می باشد. این ویروس RNA دار و سنس مثبت است و به عنوان مهم ترین عامل بیماری مزمن کبدی، شناخته می شود (۱). عفونت هپاتیت C می تواند از طریق خون آلوده از شخصی به شخص دیگر منتقل گردد. تقریباً ۲۰٪ از افراد مبتلا به عفونت حاد هپاتیت C، بدون هیچ درمانی بهبود پیدا می کنند؛ در حالی که حدود ۸۰٪ از افراد بیمار تا دهه ها دچار فرم مزمن این بیماری هستند (۲). این ویروس، دارای ۸ ژنوتیپ و بیش از ۸۶ زیر گروه می باشد (۳). پروتئین هایی که توسط ژنوم ویروس هپاتیت C کد می شوند، در دو دسته ساختاری (پروتئین هسته، گلیکوپروتئین E1 و E2) و غیرساختاری (NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B, P7) قرار می گیرند (۴، ۵).

بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) تا سال ۲۰۱۹، ۷۱ میلیون نفر در جهان به این عفونت مبتلا بوده اند (۶). هم چنین تا سال ۲۰۱۹، ۰/۳٪ از جمعیت ایران به این عفونت مبتلا شده اند (۷). میزان ابتلا به این ویروس در بین اهداکنندگان خون ایران ۰/۰۴٪ ارزیابی شده است (۸).

میکروRNAها گروهی از RNAهای غیر کدکننده کوچک با طول ۲۱-۲۴ نوکلئوتید هستند که در شرایط سخت مانند pH بالا یا پایین و دمای کم یا زیاد، پایدار می باشند (۹-۱۱).

مشخص شده است که سطح میکروRNAها در پلاسما یا سرم افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم، متفاوت است (۱۱). از طرفی، در مایعات بدن پایدار و به راحتی قابل ارزیابی می باشند (۱۲). در نتیجه، مطالعه ها بیان داشته اند که بررسی تغییرات میکروRNAهای میزبان، در بیماری های مختلف مانند عفونت هپاتیت C ممکن است اطلاعات مفیدی از بیماری های متفاوت از جمله بیماری های کبدی مرتبط با ویروس هپاتیت C را فراهم آورد (۱۳).

مطالعه ها نشان دادند که miR-199a با اتصال دومین II ناحیه IRES ویروس هپاتیت C، سبب مهار تکثیر ویروس می شود (۱۴).

مشاهده شده است که miR-196 تاثیر مستقیم بر روی

ژنوم ویروس هپاتیت C دارد و با اتصال به ناحیه NS5A مانع از همانندسازی ویروس می شود (۱۵). این میکروRNA در فرآیندهایی مانند دفاع علیه ویروس و التهاب، تکامل و ایمنی زایی نقش دارد (۱۶).

بر اساس مطالعه های گذشته و با توجه به تاثیر ویروس هپاتیت C بر سطح بیان میکروRNAها و هم چنین تاثیر miR-199a و miR-196b بر ژنوم ویروس هپاتیت C، در این مطالعه پایه ای، به بررسی سطح بیان این دو میکروRNA در سرم اهداکنندگان خون مبتلا به هپاتیت C فاقد علائم در مقایسه با سرم اهداکنندگان خون سالم، پرداخته شد (۱۹-۱۷، ۱۳، ۱۲). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و پس از بررسی پروفایل بیانی سایر میکروRNAها و عوامل مرتبط با این بیماری در مطالعه های بعدی، می توان ارزش تشخیصی آنها را مورد پژوهش قرار داد.

**مواد و روشها**

مطالعه از نوع مورد- شاهد بوده و در شهر تهران در سال ۱۳۹۸-۱۳۹۷ انجام شده است. از نمونه سرم ۱۰۶ اهداکننده خون مبتلا به هپاتیت C فاقد علائم به عنوان گروه مورد و نمونه سرم ۱۰۶ اهداکننده خون سالم به عنوان گروه شاهد در این مطالعه استفاده شده است. لازم به ذکر است که اهداکنندگان، فاقد HBsAg، HIV Ab و بیماری های زمینه ای کبدی بودند و روش نمونه گیری در هر دو گروه، غیر احتمالی آسان بود. هم چنین، گروه مورد در این مطالعه، در زمان اهدای خون از بیماری خود اطلاع نداشتند.

**استخراج Total RNA**

از نمونه های سرم گروه مورد و شاهد، با استفاده از محلول RNX-Plus (سیناکلون، ایران) با Cat. No. EX6101، استخراج Total RNA انجام شد. در ابتدا به مقدار ۲۵۰ میکرولیتر سرم، ۱ میلی لیتر محلول RNX-Plus اضافه شد. سپس، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) انکوباسیون شدند. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد (۴ درجه سانتی گراد) به نمونه ها اضافه گردید و به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق، انکوباسیون انجام شد. به

آنزیم RT، ۲ میکرولیتر از dNTP و ۴ میکرولیتر از بافر RT به سایر اجزا اضافه و با آب DEPC به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. ساخت cDNA، با استفاده از برنامه دمایی موجود در جدول انجام شد (جدول ۱).

#### واکنش Real-time PCR:

به منظور سنجش سطح بیان میکروRNAها، واکنش Real-Time PCR انجام شد. برای انجام این واکنش، از کیت BON-miR High-Specificity miRNA QPCR Core SYBR Reagent Kit (بن یاخته، ایران) مبتنی بر روش SYBR Green و دستگاه Corbett Rotor Gene 3000 Real Time (کیاژن، آلمان) استفاده شد. این واکنش با ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر جلوبرنده اختصاصی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس Universal و ۶/۵ میکرولیتر از Master mix و ۴/۵ میکرولیتر آب فاقد DNase انجام شد. از برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۴۰ چرخه (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه) برای واکنش Real-Time PCR استفاده شد. لازم به ذکر است که آزمایش‌ها با دو بار تکرار انجام گرفت. همچنین، به منظور فعال‌سازی سطح بیان هر میکروRNA در هر نمونه، از ژن خانه‌دار snRNA-U6 استفاده شد. پس از انجام واکنش، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نیز انجام شد.

#### آنالیزهای آماری:

سنجش اختلاف معناداری سن با استفاده از آزمون t-test و جنسیت با استفاده از آزمون کای‌دو موجود در نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 26.0 برای هر دو گروه مورد بررسی انجام شد. چرخه‌های آستانه (Ct) به دست آمده از دستگاه Real-Time PCR توسط نرم‌افزار REST 2009 v2.0.13 تجزیه و تحلیل شدند و سطح معناداری از  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد. رسم شکل miR-196b با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism v8.0.2 انجام شد.

این مطالعه پس از تصویب توسط کمیته اخلاق در پژوهش مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد IR.TMI.REC.1398.016 انجام شد.

مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و پس از اضافه کردن اتانول مطلق سرد (دو برابر حجم محلول) به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی را دور ریخته و ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) بر روی رسوب اضافه گردید. به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی را دور ریخته و رسوب باقی‌مانده در دمای اتاق، زیر هود کلاس دو خشک گردید. در انتها، رسوب Total RNA در ۲۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد. غلظت و خلوص توتال RNA های استخراج شده نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-1000 (آمریکا، Thermo Fisher Scientific) سنجیده شد.

#### ساخت cDNA:

ساخت cDNA با استفاده از روش کار موجود در کیت BON-miR miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (بن یاخته، ایران) با Cat. No. BON209001 و دستگاه ترموسایکلر PeqSTAR (آلمان، پکلب) انجام شد.

جدول ۱: برنامه دمایی ساخت cDNA

تعداد چرخه	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)
	۱۰	۲۵
۱	۶۰	۴۲
	۱۰	۷۰

در ابتدا مقدار ۱ میکروگرم از Total RNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر از کیت آغازگر (شامل آغازگر Stem-loop مربوط به miR-199a و miR-196b و ژن کنترل داخلی (snRNA-U6))، به میکروتیوب منتقل شد و با آب DEPC به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در ادامه مقدار ۱ میکرولیتر از

**یافته‌ها**

برای بررسی نتایج سنجش اختلاف معناداری سن و جنسیت، از آزمون کای دو و t موجود در نرم افزار IBM SPSS Statistics 26.0 استفاده و مشخص شد که سن و جنسیت افراد بین دو گروه اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند (جدول ۲).

جدول ۲: اطلاعات مربوط به سن و جنسیت اهداکنندگان در گروه مورد و شاهد

میانگین سن ± انحراف معیار	گروه شاهد		گروه مورد		p
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
مرد	۱۰۲	۹۶/۴	۹۵	۹۰	۰/۰۶۱
زن	۴	۳/۶	۱۱	۱۰	
جمع جنسیت کل	۱۰۶	۱۰۰	۱۰۶	۱۰۰	

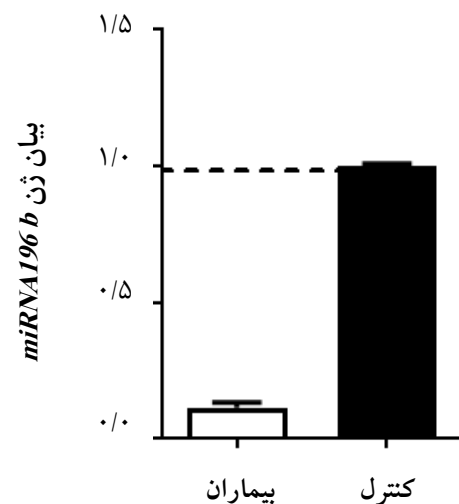
تغییرات سطح بیان miR-196b در دو گروه مورد مقایسه: با توجه به داده‌های آماری این مطالعه، سطح بیان miR-196b در نمونه سرم اهداکنندگان خون مبتلا به هیپاتیت C فاقد علائم نسبت به نمونه سرم اهداکنندگان خون سالم کمتر بود (Fold change = ۰/۱۱۶) و با سطح معناداری  $p < ۰/۰۰۱$  تایید شد (نمودار ۱).

تغییرات سطح بیان miR-199a در دو گروه مورد مقایسه: سطح بیان miR-199a اختلاف معناداری در نمونه سرم اهداکنندگان خون آلوده به هیپاتیت C فاقد علائم در مقایسه با نمونه سرم اهداکنندگان خون سالم نشان نداد (۰/۰۰۱ < Fold change).

**بحث**

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل‌های آماری این مطالعه نشان‌دهنده کمتر بودن سطح بیان miR-196b در سرم اهداکنندگان خون آلوده به هیپاتیت C فاقد علائم در مقایسه با اهداکنندگان خون سالم بود (Fold change = ۰/۱۱۶). در حالی که سطح بیان miR-199a در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معناداری را نشان نداد (Fold change = ۰/۰۰۱).

در سال ۲۰۱۹ محمد ال-هفنی و همکارانش، افزایش سطح بیان miR-199 را در نمونه سرم بیماران مبتلا به هیپاتیت C مزمن آلوده به ژنوتیپ ۴ ویروس هیپاتیت C (گروه مورد) در مقایسه با نمونه سرم افراد سالم (گروه شاهد) گزارش کردند. آن‌ها بیان کردند که miR-199 با سن، رابطه مثبت داشته است (۱۲). پژوهش فوق، اطلاعات مفیدی را در خصوص ارتباط مثبت سن با miR-199 ارائه کرده است اما از آنجایی که در این مطالعه، رده سنی انتخاب شده (گروه مورد برابر ۱۲ ± ۳۹/۱ سال و گروه شاهد برابر ۹/۶ ± ۴۰/۴ سال) گروه‌های سنی متفاوتی را شامل نمی‌شود، به بررسی‌های بیشتر در مورد این ارتباط، نیاز می‌باشد. در مطالعه ما به دلیل محدودیت‌های موجود، به بررسی این امر پرداخته نشد. نتیجه مطالعه ما با یافته پژوهش فوق مبنی بر افزایش سطح بیان miR-199 در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد متفاوت است. یکی از دلایل



نمودار ۱: سطح بیان miR-196b در اهداکنندگان خون مبتلا به هیپاتیت C فاقد علائم (Sample) و اهداکنندگان خون سالم (Control)

محمد ال-گوئندی و همکاران در سال ۲۰۱۶ پژوهشی را انجام دادند که نتایج آن نشان‌دهنده افزایش سطح بیان miR-196b در بیوپسی بافت کبد افراد مبتلا به هپاتیت C مزمن نسبت به بیوپسی بافت کبد افراد سالم بوده است. در این مطالعه، بین سطح بیان miR-196b با شاخص‌های بیوشیمیایی و بالینی مانند سن، تیترو ویروس، سطح سرمی آنزیم‌های کبدی، سطح AFP و استئاتوز ارتباط معناداری مشاهده نشده است (۱۷). نتیجه مطالعه ما برخلاف یافته پژوهش فوق، کمتر بودن سطح بیان miR-196b را در گروه مورد نسبت به گروه شاهد نشان داد. از تفاوت‌های میان مطالعه ما و محمد ال-گوئندی می‌توان به متفاوت بودن نوع نمونه اشاره کرد. در مطالعه ما، از سرم و در پژوهش فوق از بیوپسی بافت کبد استفاده شده است. هم‌چنین، مطالعه ما بر خلاف پژوهش فوق، از حجم نمونه بیشتر و یکسان، برای هر دو گروه مورد بررسی برخوردار بوده است که می‌تواند نتایج دقیق‌تری را منجر شود.

پژوهش دیگری توسط گرک و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت. در این مطالعه، سطح بیان miR-196b در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) در بیماران مبتلا به هپاتیت C مزمن را سنجیدند. آن‌ها دریافتند که، هنگامی که هر دو رشته ژنوم مثبت و منفی در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی وجود دارند، سطح بیان این میکروRNA بیشتر از هنگامی است که فقط رشته مثبت ژنوم در PBMCs وجود دارد. زیرا miR-196b در پاسخ‌های ایمنی میزبان نقش دارد و وجود دو رشته از ژنوم در PBMCs، نشان از تکثیر ویروس دارد و از این طریق در مهار تکثیر ویروس هپاتیت C نقش دارد (۲۳). با توجه به نتیجه حاصل از مطالعه‌ی محمد ال-گوئندی، می‌توان دریافت که احتمالاً افزایش سطح بیان این میکروRNA در محل‌هایی می‌باشد که ویروس هپاتیت C تکثیر دارد (۱۷).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط اسکگنولاری و همکارانش در ایتالیا انجام شده، اختلاف معناداری در سطح بیان miR-196 در ۱۲ نمونه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به عفونت هپاتیت C مزمن در مقایسه با ۱۰ نمونه از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد سالم مشاهده نکردند. آن‌ها اظهار داشتند که این نتیجه

احتمالی تفاوت در یافته‌های دو مطالعه را، می‌توان به رده سنی افراد مورد بررسی نسبت داد.

پژوهش دیگری که در مصر توسط ال-آهوانی و همکارانش در سال ۲۰۱۹ انجام شد، افزایش سطح بیان miR-199a را در سرم مبتلایان به هپاتیت C همراه با فیروز (آلوده به ژنوتیپ ۴ ویروس) در مقایسه با نمونه‌های سرم افراد سالم گزارش دادند. هم‌چنین، بیان کردند که سطح بیان miR-199a در سیروز کبدی نسبت به فیروز کاهش داشته است. از دیگر نتایج این پژوهش، کاهش سطح بیان miR-199a در نمونه سرم بیماران مبتلا به سرطان کبد ناشی از هپاتیت C در مقایسه با نمونه سرم افراد سالم، افراد آلوده به هپاتیت C همراه با فیروز و سیروز کبدی بود (۲۰). با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان به حساسیت این میکروRNA نسبت به مراحل مختلف بیماری اشاره کرد. از آنجایی که نتیجه مطالعه ما با یافته پژوهش فوق متفاوت می‌باشد، این تفاوت در یافته‌ها ممکن است به متفاوت بودن احتمالی ژنوتیپ‌های شایع در گروه‌های مورد بررسی مربوط باشد. چرا که ژنوتیپ بر سطح بیان میکروRNA مؤثر است (۲۱، ۲۰). ژنوتیپ ۴ ویروس هپاتیت C در کشور مصر شایع بوده، در حالی که ژنوتیپ ۳a در میان اهداکنندگان خون ایران، ژنوتیپ شایعی می‌باشد (۲۲، ۱۷).

مطالعه‌ای در کشور تایوان در سال ۲۰۱۴ توسط چنگ و همکاران انجام شد. آن‌ها افزایش سطح بیان miR-199a را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد مبتلا به هپاتیت C مزمن که تحت تیمار با ریبوایرین و اینترفرون بوده‌اند، در مقایسه با افراد سالم گزارش کردند. آن‌ها هم‌چنین بیان داشتند که سطح بیان این میکروRNA در بیماران دارای ژنوتیپ ۱ ویروس هپاتیت C بیشتر از بیماران مبتلا به سایر ژنوتیپ‌های ویروسی است. در نهایت، آن‌ها اظهار داشتند که ممکن است miR-199a پتانسیل استفاده به عنوان مارکری جهت تشخیص عفونت هپاتیت C مزمن را داشته باشد (۲۱). از آنجایی که در مطالعه ما تفاوت معناداری برای miR-199a در گروه مورد نسبت به شاهد مشاهده نشد، ممکن است بتوان تفاوت در یافته‌های دو پژوهش را به نوع نمونه استفاده شده در دو مطالعه نسبت داد.

**نتیجه‌گیری**

با توجه به آنالیزهای آماری این پژوهش، در نمونه سرم اهداکنندگان خون مبتلا به هپاتیت C فاقد علائم در مقایسه با نمونه سرم اهداکنندگان خون سالم، سطح بیان miR-196b کمتر بوده و سطح بیان miR-199a بدون اختلاف معنادار گزارش شد. بر این اساس می‌توان مطالعه‌های بیشتر در مورد نقش miR-196b در بیماری هپاتیت C و مطالعه سطح بیان miR-199a در ژنوتیپ‌های متفاوت این ویروس را حائز اهمیت دانست.

**تشکر و قدردانی**

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست فناوری پزشکی در مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1398.016 می‌باشد. بدین وسیله از مؤسسه، به جهت حمایت‌های مادی و معنوی تشکر می‌گردد.

ممکن است به دلیل پایین بودن تعداد نمونه‌های مورد بررسی باشد (۲۴). از آنجایی که نتایج مطالعه ما با یافته‌های این پژوهش متفاوت بوده، این تفاوت می‌تواند به نوع و حجم نمونه مورد استفاده در دو مطالعه مربوط باشد. در نهایت پیشنهاد می‌شود با توجه به مطالعه‌های قبلی مبنی بر تاثیر ژنوتیپ بر سطح بیان میکروRNAها، بررسی سطح بیان miR-199a و miR-196b به تفکیک ژنوتیپ ویروسی انجام شود. همچنین، تاثیر میکروRNAها بر روی ژنوم ویروس هپاتیت C با استفاده از مطالعه‌های کشت سلولی، به درک بهتر تاثیر متقابل میکروRNAها و ویروس هپاتیت C منجر می‌شود.

با توجه به بررسی‌های انجام شده بر روی مطالعه‌های مربوط به سطح بیان miR-196b، پژوهش مشابهی در نمونه سرم بیماران مبتلا به هپاتیت C یافت نشد. لذا، نتایج حاصل از مطالعه ما می‌تواند اطلاعات جدیدی را در این زمینه ارائه کند.

**References:**

- Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, Cosset FL. Overview of HCV life cycle with a special focus on current and possible future antiviral targets. *Viruses* 2019; 11(1): 30.
- Geddawy A, Ibrahim YF, Elbahie NM, Ibrahim MA. Direct acting anti-hepatitis C virus drugs: clinical pharmacology and future direction. *J Transl Int Med* 2017; 5(1): 8-17.
- von Massow G, Garcia-Cehic D, Gregori J, Rodriguez-Frias F, Macià MD, Escarda A, *et al.* Whole-genome characterization and resistance-associated substitutions in a new HCV genotype 1 subtype. *Infect Drug Resist* 2019; 12: 947-55.
- Gao J, Ju C. Research progress on the direct antiviral drugs for hepatitis C virus. *Biosci Trends* 2017; 11(1): 41-5.
- Ghasemi F, Rostami S, Meshkat Z. Progress in the development of vaccines for hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2015; 21(42): 11984-2002.
- WHO. Hepatitis C. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> [27 July 2020].
- Teimoori A, Ebrahimi S, Keshtkar N, Khaghani S, Salmanzadeh S, Ghafari S. Prevalence and genetic diversity of HCV among HIV-1 infected individuals living in Ahvaz, Iran. *BMC Infect Dis* 2019; 19(1): 389.
- Kermani FR, Hosseini KM, Kafi-Abad SA, Mansournia MA, Sharifi Z, Maghsudlu M. Hepatitis C (HCV) Viremic Rate and its Correlation to Demographic Factors among HCV Confirmed Iranian Blood Donors. *Arch Iran Med* 2019; 22(2): 76-9.
- Kažna EM. MicroRNA-155 and microRNA-196b: promising biomarkers in hepatitis C virus infection? *Rev Med Virol* 2014; 24(3): 169-85.
- Yuan H-L, Wang T, Zhang KH. MicroRNAs as potential biomarkers for diagnosis, therapy and prognosis of gastric cancer. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 3891-3900.
- Amr KS, Ezzat WM, Elhosary YA, Hegazy AE, Fahim HH, Kamel RR. The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gene* 2016; 575(1): 66-70.
- El-Hefny M, Fouad S, Hussein T, Abdel-Hameed R, Effat H, Mohamed H, *et al.* Circulating microRNAs as predictive biomarkers for liver disease progression of chronic hepatitis C (genotype-4) Egyptian patients. *J Med Virol* 2019; 91(1): 93-101.
- Li H, Jiang JD, Peng ZG. MicroRNA-mediated interactions between host and hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2016; 22(4): 1487-96.
- Murakami Y, Kawada N. MicroRNAs in hepatic pathophysiology. *Hepato Res* 2017; 47(1): 60-9.
- Shrivastava S, Steele R, Ray R, Ray RB. MicroRNAs: role in hepatitis C virus pathogenesis. *Genes Dis* 2015; 2(1): 35-45.
- Liu B, Xiang Y, Zhang HS. Circulating microRNA-196a as a candidate diagnostic biomarker for chronic hepatitis C. *Mol Med Rep* 2015; 12(1): 105-10.

- 17- El-Guendy NM, Helwa R, El-Halawany MS, Ali SAR, Aly MT, Alieldin NH, *et al.* The liver MicroRNA expression profiles associated with chronic hepatitis C virus (HCV) genotype-4 infection: a preliminary study. *Hepat Mon* 2016; 16(4): e33881.
- 18- Hou W, Tian Q, Zheng J, Bonkovsky HL. MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins. *Hepatology* 2010; 51(5): 1494-504.
- 19- Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 2009; 50(3): 453-60.
- 20- El-Ahwany EG, Mourad L, Zoheiry MM, Abu-Taleb H, Hassan M, Atta R, *et al.* MicroRNA-122a as a non-invasive biomarker for HCV genotype 4-related hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Arch Med Sci* 2019; 15(6): 1454-61.
- 21- Chang CC, Lin CC, Hsieh WL, Lai HW, Tsai CH, Cheng YW. MicroRNA expression profiling in PBMCs: a potential diagnostic biomarker of chronic hepatitis C. *Dis Markers* 2014; 2014: 367157.
- 22- Ranjbar Kermani F, Amini Kafi Abad S, Mousavi Hosseini K, Maghsudlu M, Sharifi Z. Update on HCV genotypes among Iranian blood donors. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2020; 17(1): 1-12. [Article in Farsi]
- 23- Grek M, Piekarska A, Bartkowiak J, Fendler W, Kuydowicz J, Wroblewski P, *et al.* Coordinated increase of miRNA-155 and miRNA-196b expression correlates with the detection of the antigenomic strand of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med* 2011; 28(5): 875-80.
- 24- Scagnolari C, Zingariello P, Vecchiet J, Selvaggi C, Racciatti D, Taliani G, *et al.* Differential expression of interferon-induced microRNAs in patients with chronic hepatitis C virus infection treated with pegylated interferon alpha. *Virology* 2010; 7(1): 311.

## Original Article

## Changes of miR-199a and miR-196b expression levels in blood donors suffering from asymptomatic hepatitis C

Mohammadpour M.<sup>1</sup>, Sharifi Z.<sup>1</sup>, Arabkhazaeli A.<sup>1</sup>, Ghasemi F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

Hepatitis C virus is the main cause of hepatitis C infection that usually has no symptoms at early stages. Studies have shown changes in the expression level of microRNAs in various diseases such as hepatitis. MiR-199a and miR-196b have an inhibitory effect on hepatitis C virus. In a recent study, we examined the expression levels of miR-199a and miR-196b in serum samples of asymptomatic hepatitis C infected blood donors in comparison to serum samples of healthy blood donors; based on the results, the importance of microRNAs in different stages of hepatitis C infection was evaluated.

#### Materials and Methods

In this case control study, first total RNA extraction from 106 serum samples of healthy blood donors (control group) and 106 serum samples of asymptomatic hepatitis C infected blood donors (case group) was carried out. After cDNA synthesis, the expression level of miR-199a and miR-196b were evaluated by SYBR Green real-time PCR, and the results were analyzed by REST 2009 software.

#### Results

Expression level of miR-196b in the case group compared to the control group was lower ( $p < 0.001$ ). No statistically significant difference was observed in the expression level of miR-199a between the two groups.

#### Conclusions

With regard to lower expression level of miR-196b, and given no significant difference of miR-199a expression level in the case group in comparison to the control group, future studies on the role of miR-196b in this disease are required.

**Key words:** Hepatitis C, Blood Donors, MicroRNAs

Received: 19 Jul 2020

Accepted: 17 Nov 2020

Correspondence: Ghasemi F., PhD of Medical Biotechnology. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.  
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052230; Fax: (+9821) 88601554  
E-mail: Ghasemi\_808@yahoo.com