[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره نهم، آذر ۱۳۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۱۳

بررسی میزان سطح بیانی *miR-140-5p* در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد کنترل سالم و همراهی آن با فاکتورهای بالینی

فریبا بنی طالبی دهکردی [۱]، سمیه رئیسی*[۲]

مقاله پژوهشی

مقدمه: مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک اختلال التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی می باشد. اتیولوژی مسبب MS به طور کامل مشخص نشده است و در عین حال بعضی اختلالات نورولوژیکی وجود دارند که دارای تظاهرات فنوتیپی مشابه با MS می باشند. بنابراین، یک روش تشخیصی مطمئن و در دسترس برای تشخیص افتراقی ضروری می باشد. استفاده از بیومارکرهای جدید برای تشخیص سریعتر و انتخاب درمان موثرتر یکی از دغدغه های اصلی در این زمینه می باشد. تعدادی از مطالعات اثر *miR-140-5p* بر روی تکوین سلول های T را نشان داده اند. بنابراین برای تعیین نقش آن در MS، این مطالعه برای بررسی سطح بیان آن در نمونه های MS و ارتباط آن با فاکتورهای بالینی هدایت شده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی سطح بیان *miR-140-5p* ۴۰ نمونه بیمار MS و ۴۰ فرد کنترل سالم توسط روش qPCR مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال استخراج RNA تام، بررسی بیان توسط پرایمرهای اختصاصی miRNA به صورت ساقه-حلقه انجام شده و سپس آنالیز آماری برای مشخص شدن معناداری صورت گرفت. در مرحله بعدی ارتباط فاکتورهای بالینی با میزان بیان miRNA توسط نرم‌افزار spss16 و آنالیزهای آماری T test و ANOVA سنجیده شد.

نتایج: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که میزان میانگین بیان نسبی *miR-140-5p* در نمونه های بیمار نسبت به نمونه های سالم با کاهش بیان همراه بوده است ($P<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه، کاهش بیان *miR-140-5p* در بیماری MS با پاتوژنز بیماری همراه می‌باشد، به صورتی که کاهش در بیان آن با افزایش ناتوانی همراه است. اگرچه بررسی‌های بیشتر در این مورد که miRNA به عنوان بیومارکر تشخیصی و یا هدف درمانی باشد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، *miR-140-5p*، qPCR، بیومارکر

ارجاع: بنی طالبی دهکردی فریبا، رئیسی سمیه. **بررسی میزان سطح بیانی miR-140-5p در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد کنترل سالم و همراهی آن با فاکتورهای بالینی**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۹): ۸۰۵-۷۹۶.

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۰۱، پست الکترونیکی: s.reiisi@ yahoo.com، کد پستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

مقدمه

بیمای مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) با علت ناشناخته می باشد که در این بیماری درجه بالایی از عدم تجانس با توجه به تظاهرات بالینی و پاسخ به درمان دیده می شود. روند آسیب شناسی مشترک برای انواع این بیماری، تعمیر ناکافی آسیب میلین درCNS است (۱). این بیماری در زنان شایع تر از مردان بوده و اغلب شیوع سنی در آن بین ۲۰ تا ۴۰ سالگی می باشد. سیر بیماری متفاوت بوده و می تواند از خوش خیم تا پیش رونده و ناتوان کننده باشد (۲). این بیماری باعث بروز بعضی از علائم عصبی از جمله ضعف و بی حالی در اندام های انتهایی، تغییر در توان بینایی، اختلالات در عملکرد مثانه، درد و خستگی می شود (۳). به دلیل اینکه ماهیت بیماری به طور کامل شناخته نشده است باعث شده که هیچ درمان قطعی برای آن در نظر گرفته نشود (۴-۵).

بنابراین مطالعه مولکولی در سطح mRNA جهت مقایسه وضعیت بیمار و سالم می تواند تغییرات بیانی را فراهم آورد تا راه گشایی در شناسایی بیومارکرها در تشخیص زودهنگام و یا اتخاذ مسیردرمانی مناسب این بیماری باشد (۶). از طرفی در سال‌های اخیر علاقه به مطالعه و بررسی miRNA مبتنی بر بیومارکرهایی برای MS افزایش یافته است (۷). miRNAها گروهی از RNA های غیر کد کننده هستند که حدود ۲۵-۱۸ نوکلئوتید طول دارند و پس از رونویسی بروی بیان ژن اثر می‌گذارند که این عمل از طریق اتصال به توالی مکمل که اغلب در ناحیه 3'UTR مربوط به mRNA هدف واقع شده انجام می دهند (۹-۸). miRNAها واسطه های ترجمه، مهار و یا تخریب mRNA بوسیله جفت شدن بازها هستند و در نتیجه آن ها سطح بیان پروتئین ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۱-۱۰). محققان در مطالعاتی که بر روی بیان miRNA در بیماران MS انجام دادند پی بردند miRNAها می‌توانند به عنوان نشانگرهای بالقوه در این بیماری عمل کنند (۱۲). از آن جا که MS یک بیماری بسیار ناهمگن است و با دارا بودن علائم مشترک با سایر اختلالات عصبی، نیاز به درمان‌های مختلف دارد، چنین نشانگرهایی می تواند در این زمینه بسیار مفید واقع شوند (۱۳). تعدادی از مطالعات نشان داده اند که miRNAهای درگیر در MS به طور قابل توجهی در سال های اخیر افزایش یافته اند و تقریبا ۲/۳ از مطالعات موجود در سال های اخیر را دربر گرفته است (۱۴). برای مثال، *miR-155* و miR-326 در سلول های T انسفالوژنیک و +CD4 دارای افزایش بیان هستند و با اثر بر روی سلول های Th1 و Th17 می توانند در تکوین بیماری MS می توانند نقش قابل توجهی داشته باشند (۱۶-۱۵). یکی دیگر از این miRNAها، miR-140-5p است که اولین بار در بافت غضروف و در بیماری استئوآرتریت مورد شناسایی قرار گرفت (۱۷). این miRNA سبب مهار بیان ژن هایی می‌شود که نقشی را در تکوین اوستئوآرتریت بازی می‌کنند. *miR-140-5p* در بیماری اوستئوآرتریت کاهش می‌یابد، بنابراین ژن‌های هدف آن افزایش پیدا می‌کنند و سبب تخریب غضروف می‌شوند (۱۹-۱۸). از طرفی نقش miR-140-5p به عنوان یک مهارکننده تومور در مهار متاستاز و تومورزایی نیز تایید شده است (۲۰). چنین مواردی به اهمیت این miRNA در موارد بالینی اشاره می‌کند. بنابراین در مطالعه حاضر، ما به بررسی *miR-140-5p* در بیماران مبتلا به MS پرداختیم و آن را با وضعیت سالم مورد مقایسه قرار دادیم. سپس برای مشخص شدن تاثیر این miRNA در بیماری، ارتباط آن را با شرایط مختلف بالینی مورد ارزیابی قرار دادیم.

روش بررسی

بیماران و نمونه های مورد بررسی

در مطالعه حاضر که از نوع توصیفی- تحلیلی بوده است، تعداد ۸۰ نفر وارد شدند که شامل ۴۰ بیمار مبتلا به MS و ۴۰ فرد کنترل سالم می‌باشند. معیار ورود افراد بیمار به مطالعه، براساس معیارهای مک دونالد (McDonald) (۲۱) و تأیید پزشک متخصص مغز و اعصاب بوده است. افرادی که دارای معیارهای تشخیص هر نوع بیماری عصبی غیر از MS بودند از مطالعه خارج شدند. در این مطالعه افرادی که فاقد هرگونه بیماری عصبی بوده به عنوان افراد گروه کنترل سالم مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه گیری از افراد بیمار و کنترل با روش انتخاب تصادفی انجام شد و همراه با نمونه‌گیری پرسش نامه حاوی اطلاعات دموگرافیک و سابقه پزشکی برای هر بیمار تکمیل گردید و از کلیه بیماران رضایت نامه کتبی أخذ شد

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

(۲۲). مطالعه انجام شده ابتدا در کمیته پژوهشی و اخلاق دانشگاه به شماره ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۵۹۱۲ مورد تصویب قرار گرفت.

استخراج RNA، سنتز cDNA و بررسی بیان miRNAs

RNA تام نمونه های خون به کمک کیت MN آلمان (Magnary Nagel-Germany) استخراج شد. در این مرحله به دلیل حساس بودن مراحل استخراج RNA و هم چنین مقاومت بالای آنزیم RNase تمامی مراحل استخراج RNA در شرایط عاری از RNase انجام شد. برای بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد. سپس RNAهای استخراج شده جهت انجام سایر مراحل در دمای ۷۰ – درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۲۲). سنتز DNA مکمل (cDNA) بر روی ۲ میکروگرم از total RNA و با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن کنترل داخلی (U6) و miR-140-5p به صورت ساقه حلقه (stem loop) انجام شد. پرایمرهای مورد نظر با کمک سایت mirbase طراحی شد و به صورت توالی زیر می باشد:

U6: 5'-
GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCACTGG
ATACGACAAAATATGGAAC-3'

miR-140: 5'-
GTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC
CAGAGCCAAC CTACCA-3'

در این روش سنتز با اضافه کردن پرایمر مورد نظر همراه با dNTP و آنزیم ریورس ترانسکریپتاز انجام می شود. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می‌شوند تا سنتز انجام شود و سپس این مرحله با انکوباسیون در ۸۵ درجه به مدت ۵ ثانیه ادامه پیدا می‌کند تا غیر فعال سازی آنزیم در واکنش انجام شود. انجام Real-time PCR با روش SYBR green با استفاده از دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Australia) انجام شد. واکنش برای ژن کنترل داخلی (U6) و miRNAs در حجم ۱۵µl شامل ۱.۵ µl از cDNA اختصاصی miRNA، 7.5 µl SYBR green master mix و ۰.۵ µl از هر کدام پرایمرهای فوروارد و ریورس می‌باشد. شرایط دمایی برای تکثیر miRNA شامل ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه بود. تمام واکنش‌ها به صورت دوبار تکرار انجام شدند و درنهایت داده‌های به دست آمده آنالیز شدند.

تعیین توالی *miR-140-5p*

برای تایید نتایج و تکثیر صحیح *miR-140-5p*، در نهایت از روش تعیین توالی استفاده شد. برای این منظور، تعدادی از نمونه های مورد نظر به صورت تصادفی با حجم بیشتر توسط qPCR تکثیر شده و برای تعیین توالی آماده شدند. واکنش تعیین توالی توسط دستگاه ABI (Capillary System) 3730XL انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز داده‌های Real-time PCR از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد. سپس داده‌ها به صورت میانگین با محاسبه میزان خطای استاندارد نمایش داده شدند. تمام تست‌های آماری به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism version 7.01 مورد تایید قرار گرفتند و نمودارها توسط نرم‌افزار رسم شد. جهت بررسی آماری داده ها، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ (SPSS v.22 Inc., Chicago,IL) استفاده شد. آزمون آماری t-test برای تعیین معنی دار بودن میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های سالم و بیمار و بررسی گروه‌های سنی و درجه ناتوانی (EDSS) استفاده شد. برای بررسی ارتباط میزان بیان ژن و طول‌مدت بیماری و نوع داروی مصرفی از روش ANOVA استفاده شد (۲۴-۲۳). سطح معنی‌داری برای محاسبات آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید شده است (کد اخلاق۱۳۳۳۰۵۰۳۹۵۹۱۲)

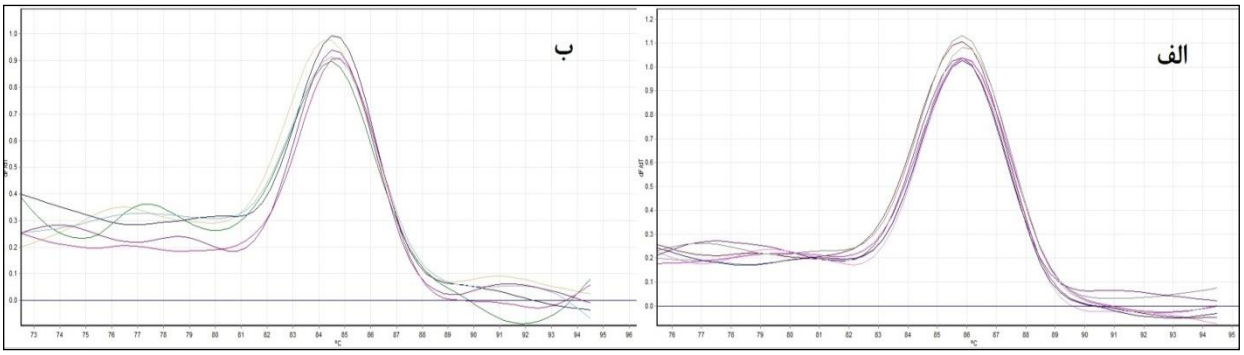
نتایج

در این مطالعه ۴۰ نمونه خون از افراد مبتلا به MS به همراه ۴۰ نمونه خون افراد سالم وارد شدند. جدول ۱ خلاصه‌ای از اطلاعات دموگرافیک و بالینی مربوط به نمونه‌های مورد بررسی را ارائه می‌دهد. برای بررسی بیان miRNAs از روش qRT-PCR استفاده شد که منحنی ذوب ژن رفرنس داخلی (U6) و *miR-140-5p* به صورت تک قله به دست آمد (شکل ۱). سپس بررسی بیان ژن برای تمامی نمونه‌ها انجام و بیان نسبی برای هر نمونه تعیین شد. بعد از آن تعدادی از نمونه‌های به صورت تصادفی انتخاب و برای تعیین توالی ارسال شدند. شکل ۲

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

کروماتوگرام مربوط به miR-140-5p تکثیر شده با روش ساقه-حلقه را نشان می دهد.

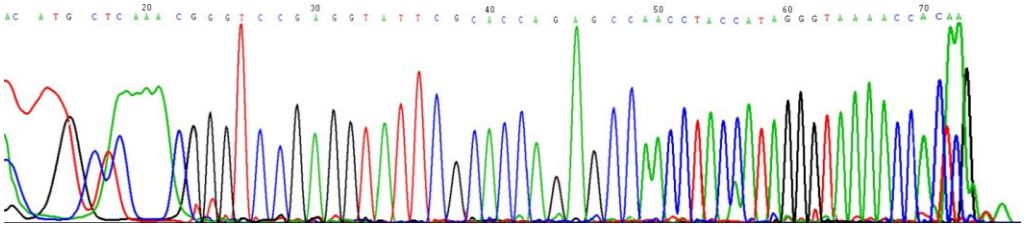
بیان نسبی *miR-140-5p* در نمونه‌های بیمار و سالم تعیین شد. بیان نسبی miRNA توسط ژن کنترل داخلی U6 نرمالیزه شد. داده ها نشان داد که بیان *miR-140-5p* به صورت معناداری در نمونه‌های MS در مقایسه با نمونه‌های کنترل سالم پایین‌تر می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱) (شکل۳- الف). برای ارزیابی اختصاصیت و حساسیت بیان miR-140-5p به منظور تمایز میان نمونه‌های بیمار و سالم آنالیز منحنی عملیاتی گیرنده **ating characteristic receiver oper** (ROC) انجام شد. سطح زیر منحنی (AUC) برای miR-140-5p برابر با ۷۶٪ (P<۰/۰۰۰۱) می‌باشد، و پیشنهاد داده می شود که این miRNA می تواند به عنوان یک بیومارکر مناسب برای بیماری RRMS باشد (شکل۳- ب). برای مشخص شدن ارتباط میان میزان بیان ژن miR-140-5p و درجه ناتوانی افراد بیمار، مطابق معیار Kurtzke افراد بیمار به دو گروه تقسیم شدند، یک دسته افراد با ناتوانی ملایم تا متوسط ودسته دیگر افراد با ناتوانی شدید بودند. در گروه اول EDSS برابر با ۰-۵/۵ می باشد که افراد دچار ناتوانی در راه رفتن و یا ناتوانی حداقل بوده و گروه دوم EDSS برابر با ۶-۱۰ می باشد که افراد در این حالت ناتوانی شدیدی در راه رفتن دارند به گونه ای که برای راه رفتن نیاز به کمک دارند و در درجات بالاتر محدود به رختخواب می شوند (۲۵). بر اساس این معیار، بیماران بر اساس مقیاس وضعیت ناتوانی گسترش یافته **Expanded Disability Status Scale** (EDSS) ارزیابی می شوند، که رتبه بندی آن ها از ۰ تا ۱۰ است و هر چه بیماران نمرات بالاتری را نشان دهند، ناتوانی در آن ها شدیدتر است (۲۶). مطابق با آنالیزهای انجام شده کاهش بیان *miR-140-5p* در حالت ناتوانی شدید در مقایسه با ناتوانی ملایم و متوسط مشاهده شد. اما با این وجود کاهش بیان مشاهده شده به صورت معنادار نبوده است (شکل ۴- الف). هم چنین برای مشخص شدن ارتباط بیان ژن با طول مدت بیماری و یا مدت زمان تشخیص بیماری تا نمونه‌گیری، افراد بیمار به چهار دسته تقسیم شدند و به گروه‌های بین ۱ تا ۲۰ سال دسته‌بندی شدند. سپس همراهی بین بیان *miR-140-5p* و مدت زمان به سال نیز سنجیده شد (شکل ۴- ب). مطابق با بررسی انجام شده، کاهش بیان miRNA همراه با افزایش طول مدت بیماری مشاهده شد، اما با این وجود این تغییر بیان در گروه‌بندی‌های انجام شده به صورت معنادار نبود (P=۰/۳). علاوه بر این موارد ارتباط میان نوع داروی مصرفی در افراد بیمار و بیان miR-140-5p نیز مورد بررسی قرار گرفت. در اینجا تعدادی از افراد بیمار که در هنگام نمونه‌گیری، دارویی مصرف نمی‌کردند به عنوان گروه استاندارد جهت مقایسه انتخاب شدند (شکل ۴- ج). مطابق با آنالیز انجام شده بیشترین میزان افزایش *miR-140-5p* در افرادی مشاهده شد که داروی گروه اینترفرون بتا (1a) را مصرف می‌کردند و بعد از آن افزایش بیان مربوط به داروی فینگولیمود بوده است. با این وجود ارتباط میان گروه‌های مختلف دارویی و گروه بدون دریافت دارو به صورن معنادار مشاهده نشد (P=۰/۰۷.).



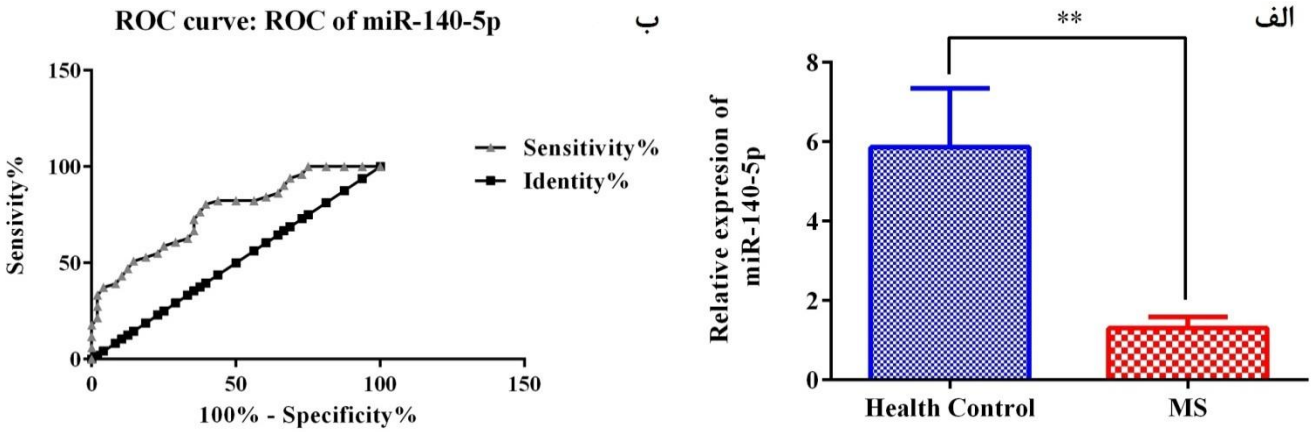
شکل ۱: نمودار های ذوب مربوط به تکثیر الف) ژن کنترل داخلی U6 و ب) miR-140-5p. وجود یک قله منفرد در نمودار ذوب نشان دهنده اختصاصی بودن تکثیر دو ژن ذکر شده می باشد.

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

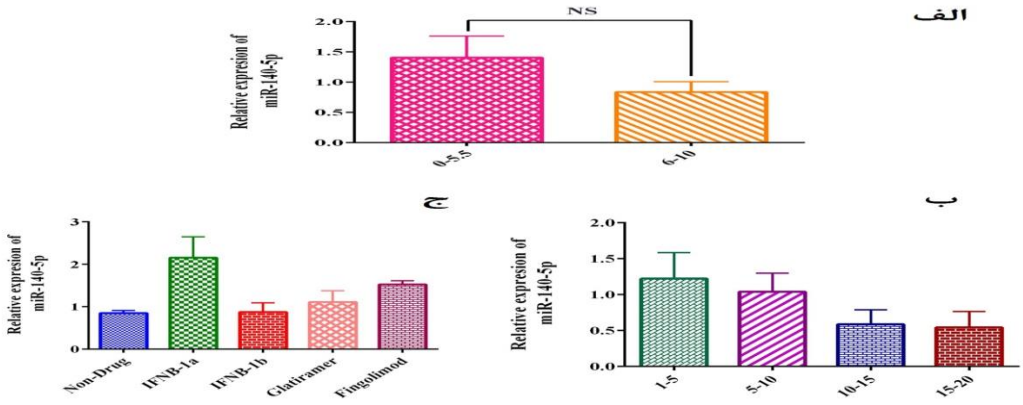


شکل ۲: کروماتوگرام مربوط به miR-140-5p تکثیر شده با روش ساقه- حلقه. تعیین توالی انجام شده با پرایمر معکوس می‌باشد.



شکل ۳: الف- نمودار مقایسه میانگین بیان ژن miR-140-5p در نمونه‌های بیمار و سالم.

ب- منحنی عملیاتی گیرنده(**ROC**)، سطح زیر منحنی امتیاز ۷۶درصد را نشان می‌دهد.



شکل ۴) نمودار ستونی مقایسه میزان بیان miR-140-5p در:

الف) گروه های EDSS ملایم و شدید

ب) طول مدت بیماری از ۱ تا ۲۰ سال

ج) گروه‌های دارویی مختلف

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

بحث

بیماری MS، یک اختلال با اتیولوژی ناشناخته می‌باشد. با وجود این که مطالعات بسیاری بر روی بیماری انجام شده و هم چنین درحال انجام است، اما مسیرهای مولکولی درگیر در بیماری هنوز به صورت کامل شناخته نشده اند. بنابراین شناخت دقیق مسیرهای درگیر در بیماری و مولکول‌هایی که در این مسیرها نقشی دارند می‌تواند از دو نظر قابل توجه باشد: اول این که در افرادی که مشکوک به بیماری شناسایی می‌شوند، این مولکول‌ها به عنوان بیومارکر در تشخیص سریع و به موقع بیماری کمک کننده باشند که این تشخیص به هنگام از عوارض جدی برای بیمار جلوگیری می کند و دوم این که چنین مولکول هایی می توانند هدف های بالقوه ای برای مسیر درمانی باشند.

در مطالعات مختلف مشخص شده است که سلول های Th به صورت قابل‌توجهی در پاتوژنز بیماری MS درگیر هستند (۲۷). بنابراین فاکتورهایی که بتوانند در تمایز و یا مهار بلوغ این سلول‌ها نقشی داشته باشند به صورتی در پاتوژنز بیماری درگیر هستند. یکی از این فاکتورها RNA های تنظیمی کوچکی می‌باشند که می‌توانند مسیرهای مختلف تکوین، تمایز، مرگ و حیات سلولی را درگیر کنند. برای مثال *miR-326* در تمایز سلول های Th17 و پاتوژنز MS نقش دارد (۱۵). *miR-155* و Let-7e سبب تمایز سلول های Th1 در مدل حیوانی بیماری MS می‌شوند (۲۸). *miR-140-5p* نیز به عنوان تنظیم کننده تکوین و عملکرد سلول‌های TH1 شناخته شده است. بیان *miR-140-5p* در سلول‌های +TCD4 نسبت به سایر سلول ها و همچنین +TCD8 غالب می‌باشد، به صورتی که کاهش بیان آن منجر به افزایش تکوین در این سلول های Th1 می‌شود و افزایش در بیان آن سبب مهار تمایز سلول‌های Th1 به صورت قابل توجهی می‌شود (۲۹). علاوه بر این سهیم‌شدن miRNAها در تنظیم بیان ژنی در بیماری MS نیز بسیار مورد توجه قرار گرفته است. به صورتی که داروهای جدید می‌توانند در زمینه بیان miRNA های ویژه‌ای و متعاقبا" فعالیت‌های ژنی مرتبط با تکثیر و فعال‌سازی سلول های افکتور توسعه یابند. برای مثال درمان با داروی ناتالیزوماب سبب بیان افتراقی دو *miR-17* و *miR-106b* در بیماران MS می‌شود و بر روی فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های +TCD4 تاثیر می‌گذارد (۳۱-۳۰). گروه دیگری از miRNA ها شامل *miR-226* و *miR-26a* که با پاتوژنز بیماری MS همراه می‌باشند به عنوان تنظیم کننده تکوین سلول های B و T و هم چنین مونوسیت‌ها می‌باشند (۳۲). اما با این همه نقش دقیق miRNA ها در پاتوژنز بیماری MS به صورت دقیق و کامل مشخص نشده است. همان طور که قبلا" اشاره شد *miR-140-5p* ، برای اولین بار در غضروف یافت شد (۱۷) و ارتباط ویژه‌ای با بیماری اوستئوآرتریت نشان داد (۱۸). اخیرا" نقش این miRNA در دیگر اختلالات بالینی نیز مشخص شده است، مثلا" *miR-140-5p* می تواند تعهد دودمانی سلول های استئوژنیک را در سلول های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته مهار کند و علاوه بر این در تشکیل کام در انسان شرکت کند، به صورتی که مهار بیان *miR-140-5p* منجر به شکاف در کام در هنگام تکوین جنین می‌شود (۳۴-۳۳). در تکوین تومورزایی نیز *miR-140-5p* به عنوان مهارکننده تومور به کار می‌رود (۲۰).

در مطالعه حاضر، بیان *miR-140-5p* در افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم کاهش بیان قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. با توجه به نقش سلول‌های T در پاتوژنز بیماری و هم چنین نقش *miR-140-5p* در مهار تمایزی این سلول‌ها می‌توان ارتباط میان این miRNA و بیماری را نتیجه گرفت. کاهش بیان miR-140-5p در افراد مبتلا به MS می‌تواند افزایش تمایز سلول‌های T را در پی داشته باشد، که در نتیجه آن با پیشرفت بیماری افزایش اثر تخریبی سلول های T بر روی میلین را نشان می‌دهد. به صورتی که کاهش بیان *miR-140-5p* در ناتوانی شدید مشاهده شد. با وجود این که این کاهش بیان معنادار نبود اما کاهش بیان به صورت واضح قابل مشاهده بود. از طرف دیگر آنالیز نمونه‌ها در منحنی ROC نشان داد که *miR-140-5p* می‌توان به صورت بالقوه بیومارکر خوبی برای بیماری MS باشد. معیار مناسب برای این بررسی در منحنی ROC سطح زیر منحنی (AUC) می‌باشد که مقدار مناسب برای آن بین ۶۰ تا ۸۰ درصد می‌باشد. این مقدار در مطالعه حاضر برابر با ۷۶ درصد بوده که سطح قابل قبولی را نشان داد. با افزایش سال درگیری بیماری کاهش بیان *miR-140-5p* در افراد بیمار نیز مشاهده شد. در افرادی که بین ۱۵ تا ۲۰ سال

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

درگیر بیماری بودند کاهش قابل توجهی در سطح بیانی این miRNA مشاهده شد. علیرغم این مورد عدم معنادار بودن این بررسی می‌تواند به دلیل تقسیم‌بندی افراد در چهار گروه و تعداد کم افراد در هر گروه تفسیر کرد. بررسی دیگر در مطالعه بررسی بیان *miR-140-5p* در گروه‌های بیمار با مصرف داروهای مختلف بود. داروها شامل اینترفرون-1a (شامل سینووکس و رسیژن)، اینترفرون-1b (زیفرون)، گلاتیرامر استات (سینومر، کوپامر) و فینگولیمود بودند. با مقایسه گروه‌های دارویی مشخص شد که مصرف سینووکس و رسیژن می تواند سبب افزایش بیان *miR-140-5p* شود. بنابراین مصرف داروها می‌تواند بر روی بیان miRNA های مختلف موثر باشد، چنین نتیجه‌ای موافق با مطالعات دیگر می‌باشد. در اثر درمان بیماران MS با فینگولیمود میزان بیان *miR-15b*، *miR-23a* و *miR-223* در گردش خون بیماران افزایش نشان داد (۳۵). اما با درمان بیماران RRMS توسط گلاتیرامر استات میزان بیان *miR-146a* و *miR-142-3p* به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۳۶).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت که miR-140-5p می‌تواند یک بیومارکر تشخیصی برای افراد مبتلا به RRMS باشد و در عین حال میزان یک هدف دارویی برای استفاده دوره‌های مختلف دارویی می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در به انجام رساندن این مطالعه، حمایت و کمکشان را دریغ نکردند به خصوص بیماران MS و کارکنان و اساتید مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ابراز می دارند. مطالعه حاضر مربوط به نتایج حاصل از پایان نامه نویسنده نفر اول می باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و با هزینه نویسندگان به انجام رسیده است.

تعارض در منافع: نویسندگان مقاله اظهار می دارند که در نوشتن مقاله سهم یکسانی داشته و هیچگونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

References:

1- Franklin RJ. ***Remyelination in the CNS: from biology to therapy***. Nat Rev Neurosci 2008; 9(11): 839-55.

2- Nabavi M, Poorfarzam SH, Ghassemi H. ***Clinical Course and prognosis of 203 patients with MS in shahid Mostafa Khomeini Hospital, Tehran 2002***. Tehran University Medical Journal TUMS Publications 2006; 64(7): 90-7.[Persian]

3- Fauci AS. ***Harrison's principles of internal medicine.*** *McGraw-Hill*, Medical Publishing Division; 2008.

4- Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. ***Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study***. Lancet Neurol 2006; 5(11): 932-6.

5- Martínez-Juárez IE, López-Meza E, González-Aragón MdCF, Ramírez-Bermúdez J, Corona T. ***Epilepsy and multiple sclerosis: Increased risk among progressive forms***. Epilepsy Res 2009; 84(2-3): 250-3.

6- Müller J, Templin A, Sauermann W. ***Epileptic seizures in multiple sclerosis***. Psychiatrie, Neurologie, Und Medizinische Psychol 1986; 38(9): 497-502.

7- Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK. ***MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis***. Autoimmun Rev 2012; 11(3): 174-9.

8- Cui J, Xi H, Cai A, Bian S, Wei B, Chen L. ***Decreased expression of Sox7 correlates with the upregulation of the Wnt/β-catenin signaling***

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

pathway and the poor survival of gastric cancer patients. Int J Mol Med 2014; 34(1): 197-204.

9- Chan DW, Mak C, Leung T, Chan K, Ngan H. ***Down-regulation of Sox7 is associated with aberrant activation of Wnt/β-catenin signaling in endometrial cancer***. Oncotarget 2012; 3(12): 1546-56.

10- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. ***Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?*** Nat Rev Genet 2008; 9(2):102-14.

11- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP**.** ***The impact of microRNAs on protein output***. Nature 2008; 455(7209): 64-71.

12- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. ***T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis***. Clin & Exp Immunol 2010;162(1):1-11.

13- Karussis D. ***The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review***. J Autoimmunity 2014; 48:134-42.

14- Martin NA, Illes Z**.** ***Differentially expressed microRNA in multiple sclerosis: A window into pathogenesis?*** Clinical and Experimental Neuroimmunology 2014; 5(2): 149-61.

15- Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, et al. ***MicroRNA miR-326 regulates T H-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis***. Nat Immunol 2009; 10(12): 1252-9.

16- O'connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, et al. ***MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development***. Immunity 2010; 33(4): 607-19 .

17- Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini MK, Clark I, et al. ***The cartilage specific microRNA140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells***. FEBS Lett 2006; 580(17): 4214-7.

18- Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, et al. ***MicroRNA- 140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin1 responses***. Arthritis Rheum 2009; 60(9): 2723-30.

19- Tardif G, Hum D, Pelletier J-P, Duval N, Martel-Pelletier J. ***Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes.*** BMC Musculoskeletal Disorders 2009;10(1):148.

20- Li W, He F**.** ***Monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD) targeted by miR-140-5p regulates tumor growth in non-small cell lung cancer***. Biochem Biophys Res Commun 2014; 450(1): 844-50.

21- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al**.** ***Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria***. Ann Neurol 2011; 69(2): 292-302.

22- Banitalebi Dehkordi F, Reiisi S, Bayati A, Mohammadinejad P. ***Studying the Expression of SNX2 (Sorting Nexin-2) in patients with RRMS compared with health control.*** Arak Med Uni J 2017; 20(3): 12-21.

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

23- Mehta CR, Patel NR. ***IBM SPSS exact tests.*** Armonk, NY: IBM Corporation. 2011.

24- Cuevas A, Febrero M, Fraiman R. ***An anova test for functional data***. Computational statistics & data analysis 2004; 47(1): 22-111.

25- Kurtzke JF. ***Rating neurologic impairment in multiple sclerosis an expanded disability status scale (EDSS)***. Neurology 1983; 33(11):1444-52.

26- Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. ***Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity***. Neurology 2014; 83(11): 1022-4.

27- Fletcher JM, Lalor S, Sweeney C, Tubridy N, Mills K. ***T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis***. Clin Expe Immunol 2010;162(1):1-11.

28- Guan H, Fan D, Mrelashvili D, Hao H, Singh NP, Singh UP, et al. ***MicroRNA let- 7e is associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis***. Eur J Immunol 2013; 43(1): 104-14.

29- Guan H, Singh UP, Rao R, Mrelashvili D, Sen S, Hao H, et al. ***Inverse correlation of expression of microRNA 140 5p with progression of multiple sclerosis and differentiation of encephalitogenic T helper type 1 cells***. Immunology 2016; 147(4): 488-98.

30- Chataway J, Miller DH. ***Natalizumab therapy for multiple sclerosis***. Neurotherapeutics 2013; 10(1): 19-28.

31- Meira M, Sievers C, Hoffmann F, Rasenack M, Kuhle J, Derfuss T, et al. ***Unraveling Natalizumab Effects on Deregulated miR-17 Expression in CD4***. J Immunol Res 2014; 2014.

32- Honardoost MA, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K, Etemadifar M, Salehi M. ***miR-326 and miR-26a, two potential markers for diagnosis of relapse and remission phases in patient with relapsing–remitting multiple sclerosis***. Gene 2014; 544(2): 128-33.

33- Suh N, Hwang S, Park Sk. ***mir-140-5p suppresses Bmp2-mediated osteogenesis in undifferentiated human mesenchymal stem cells***. The Febs J 2014; 281: 231-235.

34- Eberhart JK, He X, Swartz ME, Yan YL, Song H, Boling TC, et al. ***MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis***. Nat Genet 2008; 40(3): 290-8.

35- Fenoglio C, De Riz M, Pietroboni AM, Calvi A, Serpente M, Cioffi SM, et al. ***Effect of fingolimod treatment on circulating miR-15b, miR23a and miR-223 levels in patients with multiple sclerosis***. J Neuroimmunology 2016; 299: 81-3.

36-Waschbisch A, Atiya M, Linker RA, Potapov S, Schwab S, Derfuss T**.** ***Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis***. PloS one 2011; 6(9): e24604**.**

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.464]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:16 IRST on Wednesday February 3rd 2021

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences **Received: 20 Jun 2018**
Vol 26| NO 9 | Dec 2018 **Accepted: 4 Aug 2018**

Evaluation of the expression level of miR-140-5p in MS patients' comparison with healthy controls and their association with clinical factors

Fariba Banitalebi Dehkordi[1], Somayeh Reiisi[*2]

Original Article

Introdution: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disorder of the central nervous system. Nevertheless, the causal etiology of MS is not fully revealed and there are some neurological disorders that might have similar phenotypic manifestations with MS. Therefore, reliable and available diagnostic method is very necessary for differential diagnosis. The use of new biomarkers for faster diagnosis and selection of more efficient therapies is one of the main concerns in this area. Few studies have been conducted on the effects of miR-140-5p in T cell development. Therefore, to determine the role of this miRNA in MS, this study was directed to investigate the expression level in MS samples and its relationship with clinical factors.

Methods: In this study, expression level of miR-140-5p was evaluated in 40 MS patient and 40 health individual by using qPCR. Followed total RNA extraction, expression was investigated by miRNA specific primers by stem-loop method and then statistical analysis was accomplished to define the significance. In the next step, the correlation between clinical factors and miRNA expression was considered.

Results: The results of the present study showed that relative expression of miR-140-5pwas significantly decreased in MS patient compared with the control group ($P<0.001$).

Conclusion: As a result, miR-140-5p may contribute to MS disease, so that decrease in its expression is associated with increased disability. Further investigation can help to suggest this miRNA as diagnostic biomarkers or therapeutic targets in MS.

Keywords: Multiple sclerosis, miR-140-5p, qPCR, biomarker.

Citation: Banitalebi Dehkordi F, Reiisi S. **Evaluation of the expression level of miR-140-5p in MS patients' comparison with healthy controls and their association with clinical factors.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2018; 26(9): 796-805

[1]MSc of genetics, Department of Genetic, Islamic azad university, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran

[2]Assistant professor, Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Iran

***Corresponding author: Tel:** 03832324401-2075, **email:** s.reiisi@sku.ac.ir