

مطالعه همراهی پلی مورفیسم miR-23a rs 3745453 با مالتیپل اسکلروزیس (MS) در نمونه‌ای از

جمعیت ایران

نوین عالمشاه^۱، سویار ساری^{۱*}، رضا میرفخرایی^{۲*}

۱. گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس^۱ (MS) شایع‌ترین بیماری خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی در سنین جوانی می‌باشد. فاکتورهای مانند عوامل محیطی و زمینه ژنتیکی در ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس دخیل می‌باشند. از آنجا که miRNAها در سلول‌های عصبی و گلیال نقش مهمی در سطوح تنظیمی پس از رونویسی دارند، تغییر در عملکرد آنها به واسطه پلی مورفیسم‌ها و در نهایت تغییر بیان آنها در سیستم عصبی می‌تواند زمینه را برای بیماری‌های تحلیل برنده اعصاب از جمله مالتیپل اسکلروزیس فراهم کند. از این رو، هدف از این مطالعه، بررسی نقش پلی مورفیسم (miR 23a C>T (rs 3745453) در ایجاد بیماری مالتیپل اسکلروزیس در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۳۴ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و ۱۴۲ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. تعیین ژنوتیپ با روش Tetra ARMS PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: در هیچ یک از دو حالت توارثی غالب (OR: ۰/۷۷ (۹۵٪ CI: ۰/۴۸-۱/۲۳)، p Value > ۰/۰۵) یا مغلوب (OR: ۰/۳۶ (۹۵٪ CI: ۰/۰۸-۱/۷۵)، p Value > ۰/۰۵)، تفاوت معناداری در توزیع ژنوتیپی miR-23a rs3745453 در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس (MS) در مقایسه با افراد سالم مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران انجام گرفت، و برخلاف مطالعه‌های پیشین که نشان دهنده ارتباط این پلی مورفیسم با وقوع بیماری مالتیپل اسکلروزیس بود، در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت همراهی بین پلی مورفیسم (miR23a(rs3745453) و بیماری MS دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis)، میکرو RNA (MicroRNAs)، چندشکلی (Polymorphism).

مقدمه

بیماری MS دخیل می‌باشند. تاکنون دلیل قطعی پیدایش این بیماری مشخص نشده است. ولی به نظر می‌رسد که بروز این بیماری با پاسخ‌های خود ایمنی، لنفوسیت‌های T، آنتی‌بادی‌ها، ماکروفاژها و عوامل محیطی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها، آلودگی‌ها و سموم محیطی در ارتباط است و یک سری عوامل ناشناخته مانند استرس، فشار و هیجان روحی، زندگی ماشینی، داروها و غذاها نیز می‌توانند در بروز این بیماری نقش داشته باشند (۱۵). نرخ شیوع MS در حدود ۱-۲ در ۱۰۰۰ می‌باشد و محدوده سنی برای این بیماری ۱۷-۵۰ سال است (۶). جمعیت MS در سال ۲۰۰۷ به دو میلیون نفر در جهان رسیده است و مشخص شده که شیوع این بیماری در سراسر جهان در حال افزایش است (۱۹،۹). با توجه به طبقه‌بندی

بیماری ms یک بیماری خود ایمنی با التهاب مزمن غلاف میلین در سیستم عصبی مرکزی است (۷). مجموعه‌ای از فاکتورها مانند عوامل محیطی و زمینه ژنتیکی در ابتلا و بروز

نویسنده مسئول:

گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد

علوم دارویی تهران

پست الکترونیکی: sari. soyar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲۶/۸/۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۷/۱۲/۱۳۹۵

کشورها طبق گسترش جغرافیایی، شیوع MS در مناطق اروپای شمالی و آمریکا و شرق میانی بیش از حد بالا است (۲۰،۲۱). در دهه اخیر به طور نگران کننده ای شیوع این بیماری در ایران رو به افزایش است و شیوع آن در زنان کمابیش دو برابر مردان می باشد (۱۰،۲۸).

بیماران مبتلا به MS را بر اساس ناتوانی نورولوژیکی به چهار گروه تقسیم می کنند:

- ۱) پیش رونده ابتدایی (primary- progressive)
 - ۲) پیش رونده ثانویه ((secondry-progressive)
 - ۳) عود کننده - بهبود پذیر (remitting-relapsing)
 - ۴) عود کننده - پیش رونده (progressive-relapsing)
- ، که به طور تقریبی ۸۵٪ از بیماران از الگوی RR-MS را نشان می دهند (۱۱،۱۴). از لحاظ ژنتیکی پلی مورفیسم ژن-های زیادی در ارتباط با این بیماری شناخته شده است، به طور مثل نقش ژن های SOCS1، CD86، CTLA4، CD86، GALC، SOX8، PTPRZ1 و چندین ژن دیگر در بیماری MS به اثبات رسیده است (۱۰). اما تاکنون مطالعه های اندکی بر روی پلی مورفیسم های miRNA و ارتباط آن ها با بیماری MS انجام شده است. miRNA ها گروه کوچکی از RNA های غیرکد کننده و تک رشته ای هستند که ۱۸-۲۴ نوکلئوتید دارند و در تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی نقش مهمی را ایفا می کنند (۱،۲). آن ها نقش مهمی در پروسه های فیزیولوژی و پاتولوژیکی دارند که شامل تنظیم پاسخ های ایمنی ذاتی و اختصاصی می شود (۱۷). این تنظیم با تجزیه و یا جلوگیری از ترجمه mRNA هدف صورت می گیرد (۱۲). میکروRNA ها به طور معمول به کمک RNA پلی مراز II رونویسی شده و miRNA اولیه (primiR) را به وجود می آورند که سپس به وسیله کمپلکس پروتئینی به نام-DGCR8 DROsha به PremiR تبدیل می شود. PremiR ها از طریق پروتئین exportin5 از هسته به ماتریکس سیتوزولی منتقل می شوند و با شکسته شدن از طریق اندوریبونوکئاز Dicer به miR بالغ دو رشته ای تبدیل می گردد. در مرحله بعدی این دو رشته از هم باز شده و رشته راهنما یا miR بالغ به پروتئین آرگونات در کمپلکس RISC متصل می شود. RISC در پستانداران، موجب مهار هدفمند رونویسی می گردد. اتصال RISC به 3'UTR در mRNA مهار می شود و به این ترتیب ترجمه mRNA هدف غیرفعال می شود. mRNA غیرفعال متصل به کمپلکس miRNA-RISC در ساختار های سیتوزولی به نام P-body یا به صورت ذخیره شده باقی می ماند و یا تجزیه می شود (۲۲،۲۶). نقش تنظیم کنندگی ژن

میکرو RNA ها به خوبی شناخته شده اند و عملکرد میکرو RNA ها برای تکوین سیستم های فیزیولوژیکی و حفظ همئوستاز سلولی و عملکرد طبیعی آن ها ضروری می باشد (۱۳). عدم تنظیم بیان و عملکرد miRNA ها با بیماری های انسانی مختلف شامل سرطان، نقص دریچه قلب، تخریب نورون ها و خود ایمنی در ارتباط است (۳۱). کمابیش ۶۰٪ miRNA هایی که تا به امروز شناسایی شده اند در سیستم عصبی مرکزی (CNS) بیان می شوند (۴). تشکیل غیر طبیعی یا اختلال در حفظ میلین موجب مختل شدن هدایت پیام عصبی و در نهایت موجب تحلیل رفتن اعصاب و اختلال در فعالیت های عصبی می شود. بنابر این از آنجا که miRNA ها در سلول های عصبی و گلیال نقش مهمی در سطوح پس از رونویسی دارند و تغییر در عملکرد آن ها به واسطه پلی مورفیسم و در نهایت تغییر بیان آن ها در سیستم عصبی می تواند زمینه را برای بیماری های عصبی مانند بیماری های تحلیل برنده اعصاب از جمله بیماری MS فراهم کند (۲۵). این مطالعه برای اولین بار در ایران انجام شده است و ضرورت انجام این مطالعه بررسی نقش پلی مورفیسم miRNA 23a در ایجاد بیماری MS در جمعیت ایرانی می باشد.

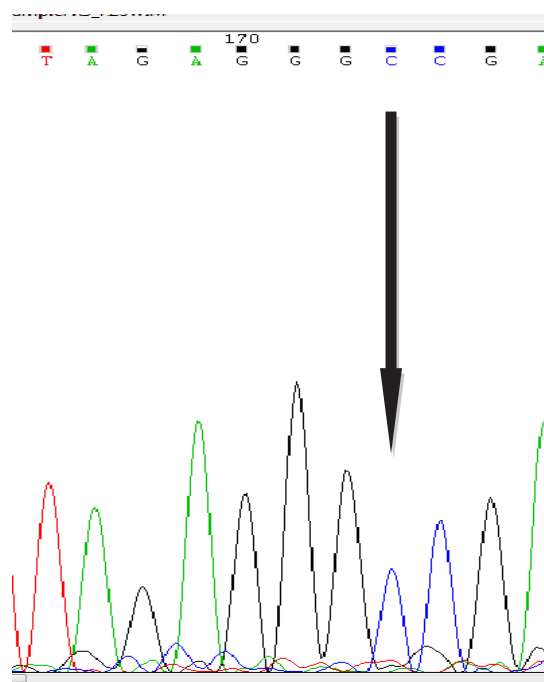
مواد و روش ها

در یک مطالعه مورد - شاهدی، نمونه گیری خون از ۱۳۴ فرد مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) که به مرکز MS همدان و بیمارستان فرشچیان مراجعه کرده بودند، و ۱۴۲ فرد سالم به عنوان گروه شاهد که بر مبنای قومیت افراد مراجعه کننده و هم چنین با در نظر گرفتن سن و جنس گروه بیمار انتخاب شده بودند، صورت گرفت. حجم نمونه بر اساس مطالعه های قبلی و بر مبنای مفهوم واژه پلی مورفیسم که به معنی وجود حداقل دو آلل شایع یا تعداد بیش تر در جمعیت با فراوانی بیش از ۱٪ است، انتخاب شد. با توجه به پرونده های بالینی افراد بیمار، همه آن ها در بازه سنی ۱۷-۶۹ سال، که ۲۹٪ آن ها را مردان و ۷۱٪ زنان بودند. هم چنین همه بیماران در فاز RR-MS به سر می بردند. برای تشخیص بیماری آن ها از تکنیک تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) که پروتکل آن مطابق با دستورالعمل های اروپا بود، استفاده گردید. اطلاعات بالینی لازم با پرسش از افراد شاهد و مطالعه پرونده بیماران پس از کسب رضایت از ایشان و مطلع سازی آنها از هدف تحقیق حاضر به دست آمد و در کمیته اخلاق با کد IR.UMSHA.REC.1394.402 به تصویب رسید.

تعیین توالی شد (شکل ۱). هم چنین نحوه عملکرد پرایمرها برای تشخیص آلل های C و T با روش Tetra- ARMS در شکل و به صورت شماتیک نشان داده شده است (شکل ۲).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی چند شکلی miR23a C>T و پرایمرهای داخلی که باعث تفاوت بین آلل طبیعی و موتانت می شوند.

پرایمر	فوروارد خارجی
توالی	5'TGGATAGGATAAGGGGGTGAGGTATG3'
پرایمر	ریورس خارجی
توالی	5'TAATAGGCAAACTCCCTTACCCAGA3'
پرایمر	فوروارد داخلی
توالی	5'TGGAAAATGTACATTGACTTAGAGTG3'
پرایمر	ریورس داخلی
توالی	5'TGGAGGCAGGACTTTCCAGAAATAGA3'



شکل ۱: نمونه ای از آنالیز سکانس شده مربوط به فردی بیمار با ژنوتیپ CC. آلل مورد نظر با علامت پیکان مشخص شده است.

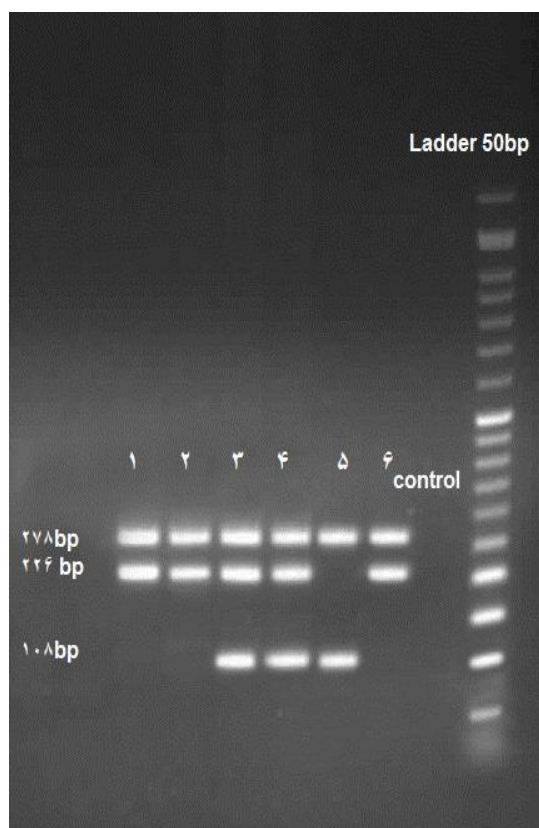
الف: نمونه گیری و استخراج DNA جهت بررسی های ژنتیکی

۴ میلی لیتر خون محیطی از افراد مورد مطالعه در لوله های حاوی EDTA گرفته شد. استخراج DNA با روش نمک اشباع (Salting out) انجام گردید و DNA استخراج شده تا زمان بررسی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ب: بررسی پلی مورفیسم miR23a C>T(rs 3745453) با روش Tetra- ARMS PCR

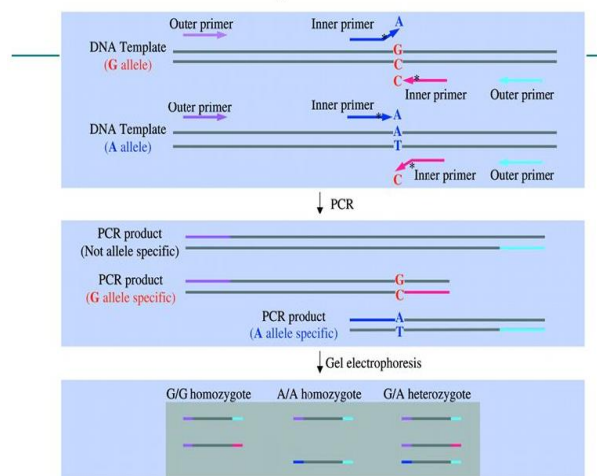
در این مطالعه، جهت بررسی چند شکلی miR-23a C>T طراحی پرایمرهای مورد نیاز به بانک اطلاعاتی dpSNP موجود در پایگاه اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> مراجعه شد با از نرم افزار Primer1 یک جفت پرایمر بیرونی (Outer) و یک جفت پرایمر درونی (Inner) طراحی گردید، هم چنین این پرایمرها توسط سرویس بلاست موجود در سایت NCBI برای یافتن نواحی دارای همولوژی در ژنوم انسان ارزیابی شدند و جهت ساخت به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. محصول ۲۷۸ نوکلئوتیدی، حاصل تکثیری است که با استفاده از پرایمرهای خارجی (Outer) صورت گرفته و به عنوان کنترل داخلی (Inner) در واکنش PCR عمل می کند و در همه ژنوتیپ ها وجود دارد. طول محصول های PCR در افراد دارای ژنوتیپ T/T، ۲۲۶ و ۲۷۸ جفت باز، در افراد C/C ۱۰۸ و ۲۷۸ جفت باز و در افراد هتروزیگوت C/T ۲۲۶، ۲۷۸، ۱۰۸ جفت باز می باشد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱۰ میکرولیتر (Amplicon Master mix PCR (Denmark ۲ X تهیه شده از شرکت ویراژن، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای داخلی، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای خارجی صورت گرفت. تکثیر در ۳۲ سیکل و تحت دماهای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۶۱/۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۷۲ درجه سانتی- گراد ۴۵ ثانیه، و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد با زمان ۵ دقیقه، انجام شد. سپس محصول های PCR روی ژل آگارز ۲٪ حاوی ۰/۷ میکرولیتر رنگ (Redsafe)، و در کنار Ladder 50bp (SMO Bio Taiwan) بارگذاری شد و باندها با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه تعدادی از نمونه ها جهت تعیین ژنوتیپ،



شکل ۳. نمونه‌ای از ژل های آگارز جهت تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم C>T در miR-23a در جمعیت مورد مطالعه. ستون‌های ۱ و ۲ و ۶ افراد با ژنوتیپ TT، ستون‌های ۳ و ۴: افراد با ژنوتیپ CT، ستون ۵: فردی با ژنوتیپ CC است.

Scheme of tetra-primer ARMS-PCR



شکل ۲: طرح شماتیک از نحوه عملکرد پرایمرها در Tetra- ARMS

آنالیز آماری

جهت تعیین وجود تعادل یا عدم تعادل هاردی - واینبرگ، در دو گروه مورد مطالعه و همچنین وجود ارتباط بین پلی- مورفیسم مورد مطالعه و وقوع بیماری MS از آزمون مربع کای و نرم افزار آنالین

SNPStats(<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق، وجود ارتباط میان پلی مورفیسم miR23a C>T با بروز بیماری ms در ۱۳۴ بیمار، مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۳ نمونه ای از نتایج الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد برای تعیین ژنوتیپ در افراد مورد مطالعه بیمار و ژنوتیپ افراد کنترل را نشان می دهد. فراوانی آلی و ژنوتیپی افراد در جدول ۲ نشان داده شده است. در هیچ کدام از حالت‌های توارثی غالب (TT vs. CT+CC)

و P value= ۰/۲۷ OR: ۰/۷۷ (۹۵CI : ۰/۴۸-۱/۲۳) مغلوب (TT+CT vs. CC)

معنی داری بین ژنوتیپ‌های دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. P Value=۰/۵۷ OR: ۰/۸۰ (۹۵CI : ۰/۳۶-۱/۷۵) ارتباط

ژنوتیپ	فراوانی بیماران (درصد)	فراوانی شاهد (درصد)	OR(95%CI)	P Value
TT	۶۰ (۴۴/۷۸)	۷۳ (۵۱/۴۱)	1 (reference)	۰/۴۴
CT	۵۹ (۴۴/۰۳)	۵۶ (۳۹/۴۴)	۱/۲۱ (۰/۷۵-۱/۹۵)	۰/۵۷
CC	۱۵ (۱۱/۱۹)	۱۳ (۹/۱۵)	۰/۷۷ (۰/۴۸-۱/۲۳)	
غالب (TT vs. CT+CC)				
مغلوب (TT +CT vs. CC)				
آل	فراوانی بیماران (درصد)	فراوانی شاهد (درصد)	OR(95%CI)	P Value
T	۱۷۹ (۶۶/۷۹)	۲۰۲ (۷۱/۱۳)	۰/۸۲ (۰/۵۷-۱/۲۷)	۰/۲۷
C	۸۹ (۳۳/۲۱)	۸۲ (۲۸/۸۷)	۱/۲۲ (۰/۸۵-۱/۷۶)	۰/۲۷

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی و آلی چندشکلی C>T در miR-23a در جمعیت مورد مطالعه. (لطفا در ردیف بالا قرار گیرد)

بحث

امروزه موضوع بررسی miRNAها و شناسایی عملکردشان در طیف گسترده ای از بیماری های انسان شامل انواع مختلف سرطان، عفونت، التهاب های مزمن و بیماری های خود ایمنی مانند MS مورد توجه قرار گرفته است (۷). بنابر این کشف نقش تنظیمی آنها نه تنها به مشخص تر شدن عملکرد بسیاری از ژن های انسان ها و موجودات دیگر کمک می کند، بلکه می تواند در تشخیص و درمان بیماری نیز به عنوان بیومارکرها کاربرد داشته باشد (۴،۵،۸).

جهش های تک نقطه ای (SNP) در توالی miRNAها با حداقل سه مکانیسم بر عملکرد تنظیمی آنها اثر می گذارد: (۱) تغییر در ناحیه Seed میکرو RNA می تواند باعث اتصال نادرست به mRNA هدف شود. (۲) SNP می تواند در پردازش Pre-miRNA به فرم بالغ یا عملکردی آن تأثیر گذارد. (۳) پلی مورفیسم miRNA می تواند باعث اشکال در تنظیم های اپی ژنتیکی ژن های miRNA شود. به همین دلیل درجه های مختلفی از میان کنش و تنظیم پس از رونویسی شامل مهار آغاز ترجمه با واسطه میکرو RNA، تجزیه پروتئین هم زمان با ترجمه و پایان پذیری ناقص ترجمه انجام می شوند. درجه مکملی بین مرکز میکرو RNA (محل مرکزی ۲ تا ۸ نوکلئوتیدی) و ناحیه ۳'UTR در mRNA هدف، مکانیسم تنظیم ژن به واسطه میکرو RNA یعنی مهار ترجمه یا تجزیه mRNA را تعیین می کند. اگر حالت مکملی بین میکرو RNA و mRNA کامل نباشد، ترجمه mRNA مهار می شود و در صورت وجود حالت مکملی کامل، mRNA هدف آدنیل شده و توسط برش اندونوکلازی ناپایدار می شود و سرانجام، میکرو RNA موجب تجزیه کامل mRNA شده و به این ترتیب از ساخت پروتئین جلوگیری می کند. (۱۶) تاکنون چندین مطالعه با هدف تعیین پروفایل بیان miRNAها در بیماران مبتلا به MS انجام شده، این مطالعه ها با تکنیک هایی مانند Taq Man-RT PCR و ریز آرایه (Micro array) صورت گرفته است که نشان دهنده تفاوت در الگوی بیانی افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم مانند کاهش بیان miR-17 و miR-20 و بالعکس افزایش بیان miR-145 در بیماران MS در مقایسه با گروه کنترل بوده است (۳۰). علاوه بر مطالعه های بیانی، ارتباط پلی مورفیسم های miRNA با بیماری MS در سال ۲۰۱۴ توسط You Li و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق که شامل ۳۸۱ زن بیمار چینی و ۳۷۸ فرد کنترل بود، ارتباط پلی مورفیسم rs2910144 G>C miR-146a با

بیماری MS بررسی شد، افزایش ژنوتیپ GC و CC در زنان بیمار چینی در مقایسه با زنان کنترل مشاهده شد ($P=0.009$)، همین طور خطر ابتلا به MS در حالت مغلوب (GG vs GC/CC) ($P=0.000$)، CI: ۰/۳۷-۰/۸۱، $OR=0.55$) افزایش یافت (۲۳).

در سال ۲۰۱۳ نیز ارتباط چند شکلی های میکرو RNA و بیماری MS توسط Eliza Ridolfi و همکاران با استفاده از Real time PCR در جمعیت ایتالیا که شامل ۳۹۹ نمونه بیمار و ۴۲۰ فرد به عنوان کنترل بود، انجام گرفت، آنها نشان دادند که بیان miR-23a در سرم بیماران MS نسبت به نمونه کنترل دچار تنظیم کاهشی شده است، هم چنین افزایش مهمی در آلل C پلی مورفیسم miR-23a C>T(rs 3745453) در مقایسه با افراد کنترل دیده شد ($p<0.001$)؛ (۲۷) $OR=1/69$ ، $95\%CI: 1/28-2/27$). ژن کدکننده miR-23a بر روی کروموزوم 13p13.13، دارای یک اگزون است و ژن FGF-2 را که یکی از فاکتورهای رشد فیبروبلاستی است، مورد هدف قرار می دهد. پروتئین FGF-2 در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مانند رشد اندام ها و گسترش سیستم عصبی، بهبود زخم و رشد تومور دخیل است (۳). بنا به گزارش های، سطح FGF-2 در CSF بیماران مبتلا به MS بالاست (۳۰). همین طور این ژن در بافت های آسیب دیده بیماران MS به میزان زیادی بیان می شود، در نتیجه FGF-2 به عنوان یک فاکتور التهابی در ضایعه های MS معرفی شده است (۱۸). از طرفی miR-23a برای تنظیم لامین B1 که برای تعمیر و نگهداری میلین مهم است، لازم است (۲۴). در مطالعه حاضر نیز پلی مورفیسم miR-23a C>T (rs 3745453) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که پلی مورفیسم miR-23a C>T با بروز بیماری MS در جمعیت ایرانی ارتباطی ندارد. در حالی که پلی مورفیسم miR-23a در جمعیت ایتالیایی با بروز بیماری MS ارتباط معناداری نشان داد. اختلاف در یافته های مطالعه مشابه با مطالعه حاضر، می تواند به علت قومیت مورد مطالعه باشد. زیرا در مطالعه های همراهی، قومیت از عوامل اصلی تعیین کننده وجود یا عدم همراهی است و هم چنین عامل دیگری که می تواند توجیه کننده تفاوت بین مطالعه ها باشد تعداد نمونه مورد بررسی است. بنابراین افزایش تعداد نمونه ها و یا بررسی همراهی در سایر قومیت های ایرانی می تواند نتایج متفاوتی به همراه داشته باشد. بنابراین توصیه می شود این مطالعه در حجم بزرگ تر و در اقوام مختلف ایرانی تکرار شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می توان گفت که پلی مورفیسم rs3745453 در ژن miR-23a ارتباط معنی داری با بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه ندارد.

سپاسگزاری

این تحقیق حاصل نتایج بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد، بدین وسیله از همکاری ارزشمند ریاست محترم آزمایشگاه ژنتیک پزشکی نیکا تهران، جناب آقای دکتر حبیب نصیری و نیز کلیه افراد شرکت کننده در طرح تحقیقاتی پایان نامه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 5-350.
2. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; 37: 70-766.
3. Clemente D, Ortega M.C, Arenzana F.J, de Castro F. FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *J. Neurosci* 2011; 31: 14899-14909.
4. Coolen M, Bally-Cuif L. MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19(5): 70-461.
5. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; 10(10): 704-14.
6. Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ, et al. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are underexpressed in MS whole blood. *PLoS One* 2010; 5(8): e12-132.
7. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 2011; 157(4): 79-163.
8. Deng JH, Deng P, Lin SL, Ying SY. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. *Methods Mol Biol* 2015; 1218: 321-40.
9. Doerksen SE, Motl RW, McAuley E. En-vironmental correlates of physical activity in multiple sclerosis: a cross-sectional study. *Int J Behav NutrPhy* 2010; 4 (1): 49.
10. Etemadifar M, Sajjadi S, Nasr Z, Firoozeei TS, Abtahi SH, Akbari M, Fereidan- Esfahani M. Epidemiology of multiple sclerosis in Iran. *Eur Neurol* 2013; 70: 356-63.
11. Goodin DS. Magnetic resonance imaging as a surrogate outcome measure of disability in multiple sclerosis: have we been overly harsh in our assessment? *Annals of neurology* 2006; 59(4): 597-605.
12. Guerau-de-Arellano M, Alder H, Ozer HG, Lovett-Racke A, Racke MK. miRNA profiling for biomarker discovery in multiple sclerosis: From microarray to deep sequencing. *J. Neuroimmunology* 2012; 248(1-2): 32-39.
13. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *MicroRNA Protocols: Springer* 2006; 9(8): 33-47.
14. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52(1): 61-76.
15. He X, Yu Y, Awatramani R, Lu QR. Unwrapping myelination by microRNAs. *Neuroscientist* 2012; 18(1): 45-55.
16. Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol Med* 2011; 17(12): 714-24.
17. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, schoenberg DR, de la Chapelle A: Common SNP in pre-miR-146a decreases mature mir expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sc U S A*. 2008; 105: 7269-7274.
18. Junker A, Krumbholz M, Eisele S, Mohan H, Augstein, F, Bittner R, et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain* 2009; 132: 3342-3352.
19. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the Northern hemisphere? *J. Neurol Sci* 2013; 311 (1): 58-63.
20. Kurtzke JF. A reassessment of the distri-bution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1998; 51(2): 110-136.
21. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Revi* 1993; 6 (4): 382.
22. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 2004; 23 (20): 60-4051.
23. Li Y, Du C, Wang W, MA G, Cui L, Zhou H, et al.; Genetic Association of MiR-146a with Multiple Sclerosis Susceptibility in the Chinese Population. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2015; 35: 281-291.
24. Lin S.T, Fu Y.H. MiR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Dis. Model Mech*. 2009; 2: 178-188.
25. Oksenberg JR. decoding multiple sclerosis: An update on genomics and future directions. *Expert Rev 22-Neurothe* 2013; 13: 11-19.

26. Reinsbach S, Nazarov PV, Philippidou D, Schmitt M, Wienecke-Baldacchino A, Muller A, et al. Dynamic regulation of microRNA expression following interferon-gamma-induced gene transcription. *RNA Biol* 2012; 9(7): 89-987.
27. Ridolfi E, Fenoglio C, Cantoni C, Calvi A, De Rize M, Pietroboni A, et al. Expression and Genetic Analysis of MicRNAs Involved in Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci* 2013; 14: 4375-4384.
28. Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moinfar Z, Lotfi J, Pakdaman H. Multiple sclerosis in Iran: a demographic study of 8000 patients and changes over time. *Eur Neurol* 2010; 64: 331-6.
29. Sarchielli P, Di Filippo M, Ercolani M.V, Chiasserini D, Mattioni A. Fibroblast growth Factor-2 levels are elevated in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci. Lett* 2008; 435: 223-228.
30. 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.
31. Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K. MicroRNAs and multiple sclerosis. *Autoimmune diseases* 2011; 8074(1): 1-27.