



## بررسی ارتباط بیان ژن های miR-455-3p و miR-125-b با شدت علائم بالینی بیماری آلزایمر

محمدرضا خاکزاد<sup>۱\*</sup>، مریم گوهری<sup>۱</sup>، فائزه باستان<sup>۱</sup>، علیرضا آل هاشمی<sup>۳</sup>، مهران همام<sup>۲</sup>، طیبه ربانی نیا<sup>۴</sup>

۱. مرکز تحقیقات نوآوری پزشکی، واحد علوم پزشکی مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۲. گروه ایمنولوژی، واحد علوم پزشکی مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۳. گروه مغز و اعصاب، واحد علوم پزشکی مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۴. گروه بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

### چکیده

### نوع مقاله: پژوهشی اصیل

**مقدمه:** بیماری آلزایمر شایع ترین نوع دمانس است که روش های غیرتهاجمی برای تشخیص زودرس آن وجود ندارد. در سال های اخیر در چندین مطالعه نقش miR-455 و miR-125 را به عنوان عامل موثر بر ژن های مرتبط با پاتوژن بیماری آلزایمر مطرح شده است. در این مطالعه ارتباط بیان ژن این دو miRNA با شدت علائم بالینی بیماری آلزایمر بررسی شد.

**روش:** ۵۰ بیمار مبتلا به آلزایمر براساس معیارهای DSM-5 شناسایی و شدت بیماری با پرسشنامه کوتاه وضعیت ذهنی (MMSE) و مقیاس جهانی ارزیابی دمانس رولاندس (RUDAS) ارزیابی شد. از بیماران خون وریدی گرفته شد و سلول های منونوکلئار خون محیطی جدا شدند. با استفاده از کیت اختصاصی MicroRNAs استخراج، از آن ها cDNA سنتز و با روش RT-PCR شدت بیان miR-455 و miR-125 تعیین شد.

**یافته ها:** ۵۰ بیمار با میانگین سنی بیماران  $76/0 \pm 7/73$  سال شامل ۵۴ درصد مرد بررسی شدند. میانگین فراوانی بیان ژن های miR-455 و miR-125 به ترتیب  $3/68 \pm 2/84$  و  $5/89 \pm 4/69$  بود که نسبت به جمعیت عادی شدت بیشتری داشته است ( $P < 0/05$ ). بین شدت بیان ژن ها با شدت بیماری ارتباط معناداری مشاهده نشد. سن، جنسیت و طول مدت بیماری ابتلا به بیماری نیز ارتباطی با شدت بیان ژن نداشت.

**نتیجه گیری:** بیان ژن های miR-455 و miR-125 در بیماران مبتلا به آلزایمر به طور معناداری بیشتر است؛ اما با شدت بیماری ارتباطی نداشت. پیشنهاد می شود در آینده مارکرهاي مرتبط با این مولکول ها در مسیرهای درون سلولی بررسی شوند.

**کلیدواژه ها:** بیماری آلزایمر، MMSE، miR-455 و miR-125، بیان ژن

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۷

\*نویسنده مسئول: محمدرضا خاکزاد، مرکز تحقیقات نوآوری پزشکی، واحد علوم پزشکی مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تلفن: ۰۹۱۵۱۱۷۶۳۵۲

پست الکترونیک:  
mr.khakzad@iaiu.ac.ir



## مقدمه

بیماری آلزایمر<sup>۱</sup> شایع‌ترین عامل زوال عقل یا دمانس در افراد سال‌خورده است، که در حال حاضر تخمین زده می‌شود. حدود ۲۷ میلیون بیمار مبتلا به آلزایمر در سرتاسر جهان وجود دارد و پیش‌بینی شده است تا سال ۲۰۵۰ این تعداد به بیش از ۸۵ میلیون نفر برسد (۱). بیماری آلزایمر یک بیماری مخرب مغزی است که با اختلالات پیشرونده شناختی و کاهش حافظه همراه است. این بیماری دارای دو خصوصیت نوروپاتولوژیکی است که یکی تجمع پلاک در قسمت خارج سلولی نورون‌ها بوده و پپتیدهای بتا آمیلوئید جزء اصلی این پلاک‌ها را تشکیل می‌دهند و دیگری تشکیل کلافه‌های نوروفیبریلاری در داخل نورون‌ها است که در اثر هیپرفسفریلاسیون پروتئین‌های تاو<sup>۲</sup> ایجاد می‌شوند. شیوع دمانس (prevalence crude National) در جمعیت عمومی، ۷/۹٪ (۸/۷٪ در زنان، و ۶/۹٪ در مردان) در جمعیت بالای ۶۵ سال برآورد شده است.

پپتیدهای بتا آمیلوئیدی (Ab)<sup>۳</sup> از شکسته‌شدن پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید تولید می‌شوند. اختلالات در عملکرد سیناپس‌ها یکی از مهمترین خصوصیت بیماری آلزایمر است که منجر به اختلالات شناختی در این بیماران می‌گردد. آمیلوئید بتا یک سم قوی برای میتوکندری‌ها محسوب می‌شود که باعث ایجاد اختلالات عملکردی در میتوکندری‌ها و در نتیجه آزاد شدن رادیکال‌های آزاد و نهایتاً آسیب نورون‌ها می‌شود. اختلال در سیستم کولینرژیک، آسیب‌های التهابی، اختلال در میزان کلسیم داخل سلولی، تحریک بیش از حد گیرنده‌های گلوتامینرژیک، تشکیل کانال‌های کاتیونی غیروابسته به ولتاژ در غشای لیپیدی توسط Ab، اختلال در انتقال آکسونی، آسیب عروق مغزی و اختلالات متابولیسم اسیدهای چرب و کلاسترول از خصوصیات دیگر پاتوفیزیولوژیکی هستند که در بیماری آلزایمر دیده می‌شوند (۲). وجود بیماری‌رانی که از نظر ژنتیکی مستعد بیماری هستند و همچنین افراد سال‌خورده سالم، این احتمال را مطرح می‌کند که سیر پاتوفیزیولوژیک این

بیماری آهسته و با تغییرات کوچک در بیوشیمی نورون‌ها اتفاق می‌افتد و پیش از فاز بیماری، فاز بدون علامت و قابل‌پیش‌گیری وجود دارد (۳).

از نظر بالینی بیماری آلزایمر به سه فاز تقسیم می‌شود: فاز بدون علامت، که افراد از لحاظ عملکردی اختلالی ندارند اما از نظر پاتولوژیک نشانه‌هایی دارند که احتمال ابتلا به بیماری در این افراد بالا است، البته این فاز همچنان به شکل فرضیه مطرح است، فاز دوم فاز پرودرومال است که معمولاً به آن اختلال شناختی خفیف گفته می‌شود و با شروع علائم شناختی اولیه (اغلب اختلال حافظه مقطعی) که کرایتریای لازم برای دمانس را ندارد، بیمار در این مرحله قرار می‌گیرد، فاز نهایی با اختلالاتی در قسمت‌های مختلف ایجاد می‌شود که به اندازه‌ای شدید باشند که اختلال عملکرد برای فرد ایجاد کنند (۴).

امروزه بررسی فاکتورهای موثر بر روی ریسک ابتلا به بیماری آلزایمر در جهت تشخیص و درمان می‌تواند مفید و کمک‌کننده باشد (۵). محققان با مطالعه بر روی بیماران نشان دادند که هر دو فاکتور ژنتیکی و محیطی بر روی خطر ابتلا به بیماری آلزایمر تاثیر می‌گذارند (۶). میکروریبونوکلئیک اسیدها (miRNA<sup>۴</sup>) RNA های کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که وظیفه‌ی تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی را برعهده دارند (۷). بنابر وظیفه‌ی مهم این مولکول‌ها، این فرضیه بیان‌شده است که اختلال در تنظیم بیان این ژن‌ها می‌تواند زیربنای پاتوفیزیولوژیک بسیاری از بیماری‌های انسان باشد (۸). نقش miRNA در سیستم عصبی مرکزی در بسیاری از فرایندها از جمله تمایز نورون‌ها و انعطاف پذیری آن‌ها اثبات شده است (۹). همچنین این فرضیه وجود دارد که به علت حمل‌شدن آن‌ها در ساختارهای محافظت‌کننده مانند لیپوزوم‌ها و آگزوزوم‌ها از تخریب حفظ می‌شوند و بنابراین، هدف مناسبی برای ردیابی در خون محسوب می‌شوند (۱۰).

با توجه به توضیحات بیان شده، تعداد زیاد مبتلایان به آلزایمر و روند رو به افزایش این بیماری و اهمیت تشخیص زودهنگام بیماری در مراحل اولیه ابتلا به آن و همچنین

<sup>۳</sup> Amyloid beta-Peptides<sup>۴</sup> MicroRNAs<sup>۱</sup> Alzheimer's Disease<sup>۲</sup> Tau protein



در مطالعه حاضر تشخیص بیماری آلزایمر مبتلایان توسط متخصص مغز و اعصاب و بر اساس معیارهای DSM<sup>52</sup> صورت گرفت و همچنین شدت بیماری آلزایمر مبتلایان با روش آزمون کوتاه وضعیت ذهنی (MMSE)<sup>3</sup> تعیین گردید (۱۱). تمامی بیماران پس از تایید بیماری توسط متخصص نورولوژیست وارد مطالعه شدند.

تظاهرات بالینی نیز با مراجعه به پرونده ی بیماران مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی شدت بیماری آلزایمر از آزمون کوتاه وضعیت ذهنی (MMSE) استفاده شد که به طور گسترده برای بررسی عملکرد شناختی افراد سالخورده مورد استفاده قرار می گیرد و شامل تست مهارت های آگاهی به زمان و مکان<sup>4</sup>، توجه<sup>5</sup>، حافظه<sup>6</sup>، کلام<sup>7</sup> و دیداری-فضایی<sup>8</sup> می باشد. بیشترین امتیاز این تست ۳۰ می باشد. طبق هنجاریابی انجام شده برای این تست در ایران، هر بیمار با امتیاز ۲۰ تا ۲۴ دمانس خفیف، ۱۳ تا ۲۰ دمانس متوسط و کمتر از ۱۲ مبتلا به دمانس شدید در نظر گرفته می شوند در نهایت داده های تهیه شده وارد چک لیست شده و پس از تکمیل چک لیست ها، داده های به دست آمده را برحسب سن، جنس و امتیاز MMSE تجزیه و تحلیل کرد.

#### روش تجزیه و تحلیل داده ها

در توصیف داده ها از جدول ها و شاخص های آماری مناسب مانند میانگین و ... استفاده شد. همچنین در تجزیه و تحلیل داده ها ابتدا نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک<sup>9</sup> مورد بررسی قرار گرفت. برای داده های غیرنرمال از آزمون من ویتنی<sup>10</sup> و کروسکال والیس<sup>11</sup> و مقایسه های دوتایی دان-ینفرونی استفاده شد و برای

استفاده از پلاسمای خون به عنوان یک روش دردسترس و غیرتهاجمی، ما در این تحقیق بر آن شدیم تا ارتباط میان بیان ژن های miR-125-b و miR-455-3p با شدت بیماری آلزایمر را در مبتلایان مراجعه کنندگان به درمانگاه مغز و اعصاب بیمارستان ۲۲ بهمن مشهد ارزیابی نماییم تا در مسیر تشخیص زودهنگام، درمان به موقع و جلوگیری از آسیب های خانوادگی و اجتماعی ناشی از آن، نقش مفیدی ایفا گردد.

#### روش

مطالعه ی مقطعی حاضر بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به آلزایمر انجام شد، بیماران آلزایمری ۵۰ تا ۸۰ سال با تشخیص بر اساس معیار های DSM-5 وارد مطالعه شدند. بیماران از نظر بالینی هر سه فاز بالینی وارد مطالعه شدند. جهت ورود به مطالعه از کلیه افراد رضایت آگاهانه دریافت شد. پس از دریافت اطلاعات اولیه، از کلیه افراد نمونه خون گرفته شد و پس از جدا کردن PBMC با سانتریفیوژ، با استفاده از کیت استخراج (Abnova RNA آمریکا) و مطابق پروتکل کیت، RNA استخراج و غلظت RNA با دستگاه نانودراپ<sup>1</sup> ارزیابی شد. با استفاده کیت سنتز (Bon-High Sensivity cDNA) و آنزیم Reverse Transcriptase از روی RNA استخراج شده، cDNA سنتز گردید. توالی RNA ژن های miR-125-b و miR-455-3p انسانی از NCBI گرفته شد و پرایمر مختص آن در نرم افزار GENE RUNNER طراحی گردید. پس از بررسی دقت پرایمر از طریق Primer Blast و سفارش پرایمر، با استفاده از آن ها و مواد کاربردی دیگر مانند مستر میکس سایبرگرین و cDNA الگو برای نمونه ها با تنظیم دمای اتصال پرایمر و Real Time PCR گذاشته شد و بیان ژن های نسبت به ژن GAPDH housekeeping مورد ارزیابی قرار گرفت.  $\Delta\Delta CT$  به دست آمده شدت بیان ژن را نشان داد.

<sup>6</sup> Memory

<sup>7</sup> Language

<sup>8</sup> Visual-spatial

<sup>9</sup> Shapiro-Wilk

<sup>10</sup> Man Whitney

<sup>11</sup> Kruskal Wallis

<sup>1</sup> NanoDrop

<sup>2</sup> Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition: DSM-5

<sup>3</sup> Mini-mental state examination

<sup>4</sup> Orientation

<sup>5</sup> Attention

داده‌های نرمال از آزمون استیودنت<sup>۱</sup> و آنالیز واریانس و مقایسه‌های دوتایی استفاده شد. جهت بررسی کلی داده‌ها از مدل خطی استفاده گردید. نرم‌افزار مورد استفاده در این پژوهش SPSS v.25 و Statistica V.12 بوده و سطح معنی داری آزمون‌ها کمتر از ۵٪ (در نتایج مقادیر کمتر از ۵٪ با علامت "\*" و مقادیر کمتر از ۱٪ با علامت "\*\*") مشخص شده است) در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

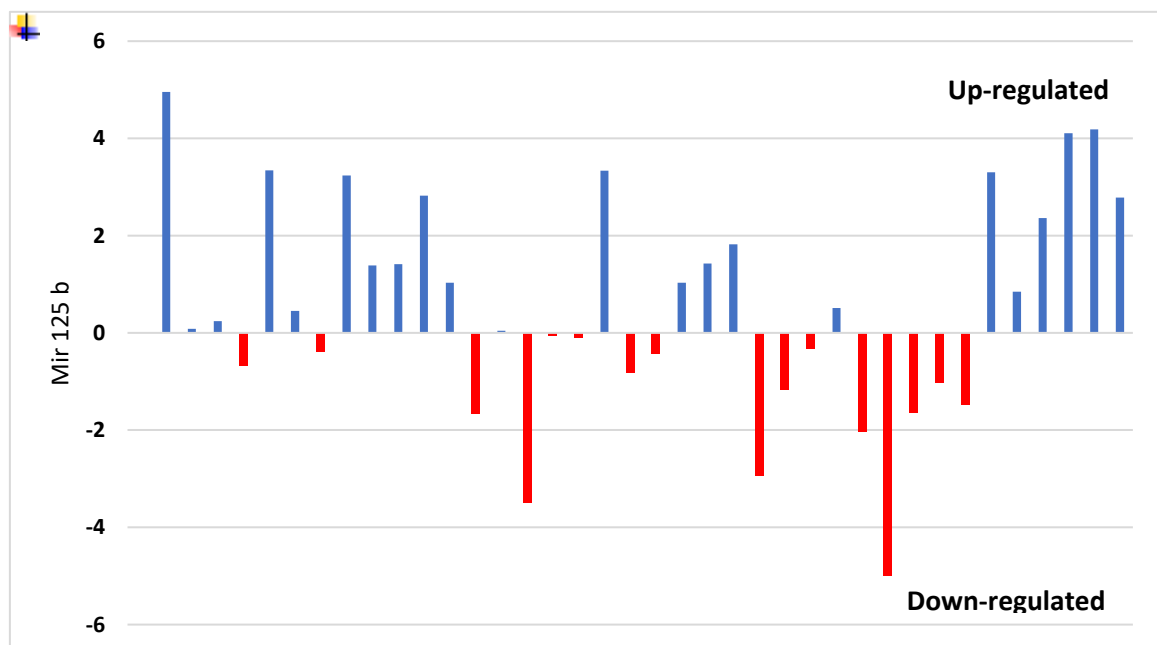
در این مطالعه تعداد ۵۰ بیمار مبتلا به آلزایمر مراجعه‌کننده به درمانگاه مغز و اعصاب بیمارستان ۲۲ بهمن مشهد در سال ۱۳۹۸ الی ۱۳۹۹ مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران شرکت‌کننده در مطالعه  $73 \pm 7/0$  سال بود. از نظر توزیع جنسیتی ۵۴ درصد بیماران را مردان تشکیل داده بودند. میانگین طول مدت ابتلا به بیماری آلزایمر  $61 \pm 21/70$  ماه بود. تنها ۳۶ درصد از بیماران دارای سابقه‌ی خانوادگی ابتلای به بیماری دیابت بودند

درحالی که سایر بیماران هیچ سابقه‌ی خانوادگی نداشتند. بر اساس معیارهای MMSE از نظر شدت بروز بیماری آلزایمر، ۳۸ درصد بیماران درجه ۱، ۳۴ درصد بیماران درجه ۲ و ۲۸ درصد از بیماران درجه ۳ بودند. میانگین (MMSE) شدت بیماری در این مطالعه  $18/92$  برای کل بیماران بود. میانگین فراوانی بیان ژن miR-125 در بیماران  $4/84 \pm 3/68$  و میانگین بیان ژن miR-455 در بیماران  $4/69 \pm 5/89$  بود که هر دو ژن نسبت به جمعیت عادی میزان بیان بیشتری داشتند. نتایج مطالعه‌ی حاضر همچنین نشان داد که بین شدت بیان ژن های miR-125 و miR-455 در بیماری آلزایمر با سن بیماران، جنسیت بیماران، طول مدت بیماری و سابقه‌ی خانوادگی ابتلا به آلزایمر ارتباطی مشاهده نشد. مفروض اصلی این پژوهش ارتباط شدت بیماری آلزایمر با شدت بیان ژن های miR-125 و miR-455 بود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد در این خصوص هیچگونه ارتباط معناداری وجود ندارد.

نمودار ۱) نتایج بررسی سطح بیان مقایسه‌ای miRNA-125b های تنظیم‌شده پایین و بالا در نمونه خون بیماران مبتلا به آلزایمر

به روش real time PCR. هیستوگرام دارای سه تکرار هستند. نتایج بیان ژن miR-125b:  $St=2.21 \pm 0.55$ ; min expression = -5.00, max expression = +4.95. بیان نسبی miR-125b ها بر اساس میانگین ژن خانگی GAPDH

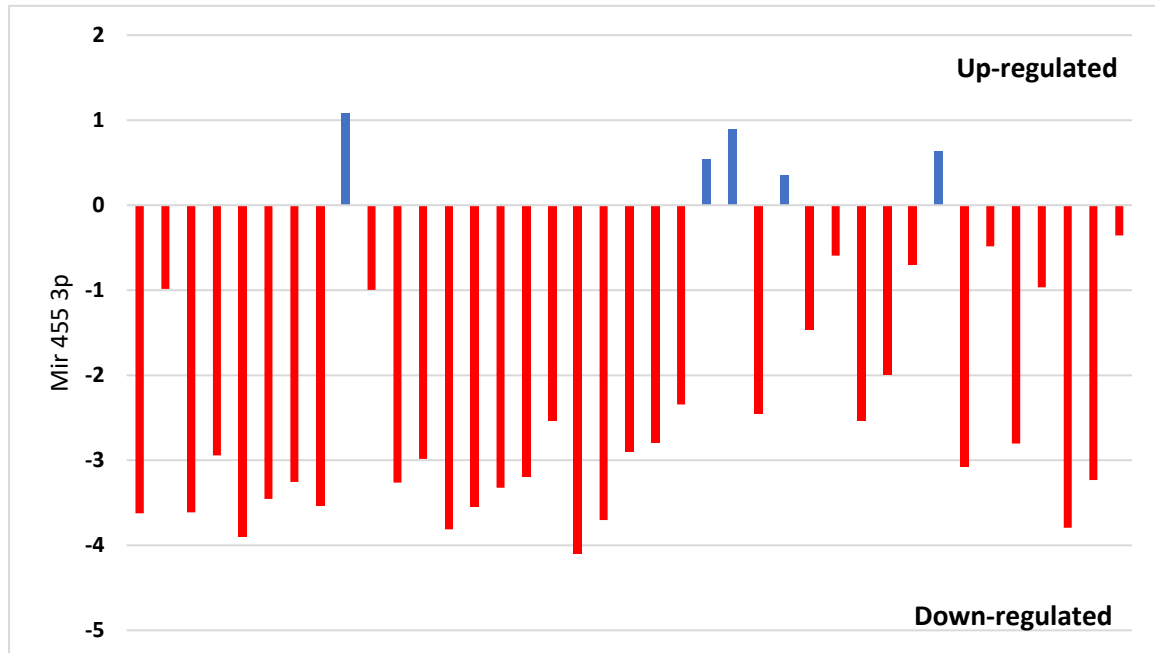
مستقل نرمال شد و در مقیاس لگاریتمی پایه ۲ بیان بیان شد.



<sup>1</sup> T student



نمودار ۲) نتایج بررسی سطح بیان مقایسه‌ای miRNA-455-3p های تنظیم‌شده پایین و بالا در نمونه خون بیماران مبتلا به آلزایمر به روش real time PCR. هیستوگرام دارای سه تکرار هستند. نتایج بیان ژن miR-455-3p =  $-1.54 \pm 2.19$ ; min expression = - (max expression =  $+1.09$ , 4.09). بیان نسبی miR-455-3p ها بر اساس میانگین ژن خانگی GAPDH مستقل نرمال شد و در مقیاس لگاریتمی پایه ۲ بیان بیان شد.

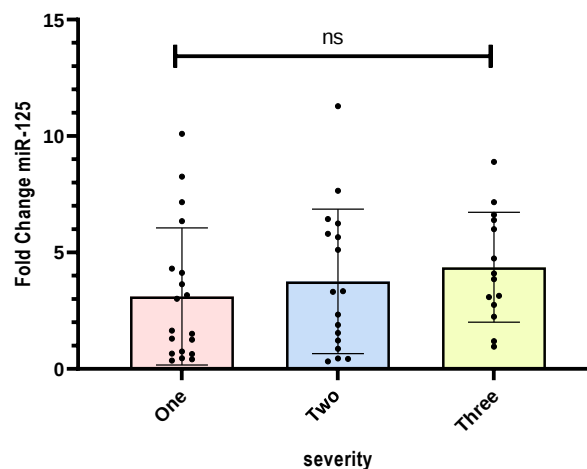


#### ارتباط شدت بیماری با شدت بیان ژن

فرضیه نرمال بودن (آزمون شاپیرو-ویلکس) بیان ژن miR-125 رد شد ( $P < 0.05$ ). اختلاف معنی‌داری (آزمون کروسکال-والیس) بین سه گروه از نظر شدت بیان ژن miR-125 مشاهده نشد ( $P\text{-Value} = 0.285$ ).

#### بحث

بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی است که به‌طور خاص افراد مسن (سن بیش از ۶۵ سال) را درگیر می‌کند (۱۲). این اختلال به صورت پیشرونده در طولانی مدت می‌تواند باعث اختلال در



نمودار ۳) ارتباط شدت بیماری با شدت بیان ژن در بیماران مبتلا به آلزایمر مراجعه‌کننده به درمانگاه مغز و اعصاب بیمارستان ۲۲ بهمن مشهد سال

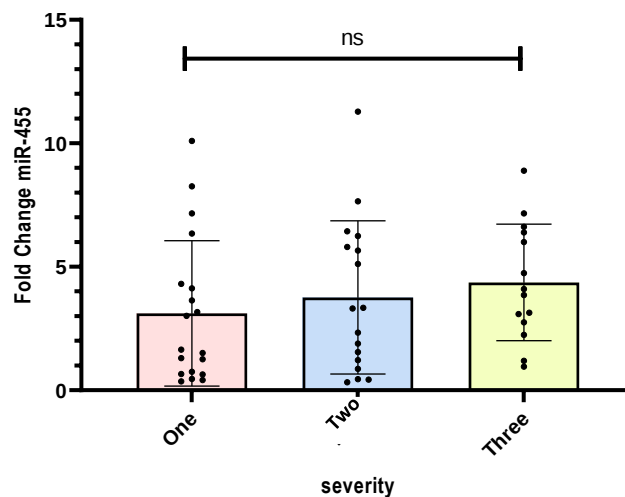
۱۳۹۸ و ۱۳۹۹

۶۰/ مجله دانشگاه علوم پزشکی نیشابور، دوره ۱۲، شماره ۱، پیاپی ۴۲، بهار ۰۳



اعصاب بیمارستان ۲۲ بهمن مشهد سال ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹

| شدت بیماری | نرمال بودن داده‌ها | کمترین | بیشترین | میانگین | انحراف معیار | آماره آزمون (مقدار احتمال) |
|------------|--------------------|--------|---------|---------|--------------|----------------------------|
| خفیف       | ۰/۰۰۷              | ۰/۳۵۴۰ | ۱۰/۰۹۸۰ | ۳/۱۱۰۲  | ۲/۹۴۴۵       | K=۲/۵۱<br>P-Value=۰/۲۸۵    |
| متوسط      | ۰/۰۸۷              | ۰/۳۲۵۰ | ۱۱/۲۸۰۰ | ۳/۷۵۷۱  | ۳/۱۰۴۰       |                            |
| شدید       | ۰/۷۸۵              | ۰/۹۵۴۰ | ۸/۸۹۰۰  | ۴/۳۶۵۷  | ۲/۳۶۳۳       |                            |



نمودار ۴) ارتباط شدت بیماری با شدت بیان ژن در بیماران مبتلا به آلزایمر مراجعه کننده به درمانگاه مغز و اعصاب بیمارستان ۲۲ بهمن مشهد سال ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹

جدول ۲) ارتباط شدت بیماری با شدت بیان ژن در بیماران مبتلا به آلزایمر مراجعه کننده به درمانگاه مغز و اعصاب بیمارستان ۲۲ بهمن مشهد سال ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹

| شدت بیماری | نرمال بودن داده‌ها | کمترین | بیشترین | میانگین | انحراف معیار | آماره آزمون (مقدار احتمال) |
|------------|--------------------|--------|---------|---------|--------------|----------------------------|
| خفیف       | ۰/۰۵۷              | ۰/۴۷۱۱ | ۱۷/۰۷۷۲ | ۷/۳۲۲۰  | ۵/۳۸۹۸       | K=۴/۰۵<br>P-Value=۰/۱۳۲    |
| متوسط      | ۰/۳۵۸              | ۰/۳۶۷۰ | ۱۴/۹۷۰۰ | ۶/۱۵۰۹  | ۴/۴۵۵۱       |                            |
| شدید       | ۰/۰۱۸              | ۰/۶۸۹۷ | ۱۰/۰۱۴۴ | ۳/۶۵۰۶  | ۳/۰۹۵۹       |                            |

عملکردهای رفتاری و شناختی مانند تکلم، حافظه، درک، توجه، استدلال و قضاوت شود. عدم کنترل این بیماری می‌تواند به سرعت کیفیت زندگی افراد مبتلا را کاهش دهد (۱۳). از آنجایی این بیماری دارای یک سیر پیشرونده است،

تشخیص زودهنگام آن و مداخله سریع در جهت جلوگیری از پیشرفت آن می‌تواند کمک شایانی به جلوگیری از بروز عوارض و حفظ کیفیت زندگی بیماران نماید. از این رو، طی سالیان گذشته مطالعات گسترده‌ای بر روی بیماری آلزایمر

در جهت کشف علت بروز و مکانیسم‌های تشخیص زودهنگام آن انجام شده است (۱۴). میکروریبونوکلیک اسیدها، RNAهای کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که وظیفه تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی را برعهده دارند، یکی از فرضیه‌های مهم در جهت پاتوفیزیولوژی بروز بیماری عصبی وجود اختلال در تنظیم بیان ژن میکروRNAها است که می‌تواند زیربنای ایجاد بیماری آلزامیر باشد (۱۵). در همین جهت این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بیان ژن‌های miR-125-b و miR-455-3p با شدت بیماری آلزامیر طراحی شده است.

در مطالعه‌ای که توسط کومار و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۸ در آمریکا انجام شد، بافت مغز از ناحیه برودمن ۱۰ بیمار، از ناحیه قشر پیشانی ۲۷ بیمار آلزامیری فوت شده و ۱۵ نفر گروه شاهد سالم فوت شده که از نظر سن و جنس یکسان‌سازی شده بودند، جدا شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح microRNA455 در بیماران مبتلا به بیماری آلزامیر به‌طور معناداری بیشتر از افراد گروه کنترل بود. این نتیجه کاملاً هم راستا و منطبق با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه‌ای حاضر بود و نشان داد که سطح miR-455 در بیماران مبتلا به آلزامیر افزایش معناداری دارد. اگرچه محل نمونه‌گیری مطالعه‌ی کومار و همکاران (۱۶) از مغز بیماران و مطالعه‌ی حاضر از نمونه‌ی خون بیماران بود، اما نتایج به‌دست‌آمده در هر دو مطالعه بیانگر افزایش معنادار سطح miR-455 نسبت به جمعیت عادی است. این یافته می‌تواند پروسه‌های التهابی ایجادشده در طی بیماری آلزامیر را نیز توجیه کند. مطالعات آزمایشگاهی قبلی انجام شده بر روی موش‌های مبتلا به بیماری آلزامیر که توسط خود کومار و همکاران (۱۷) انجام شده است، نشان داد که بیان ژن‌های miR-455 بر روی لنفوسیت‌های B موش‌های آلزامیری به‌طور معناداری بیشتر از موش‌های سالم بود. این یافته خود می‌تواند تاییدکننده‌ی تاثیر لنفوسیت‌های B در روند التهابی بیماری آلزامیر، تاثیر miR-455 بر بروز و پیشرفت بیماری آلزامیر و علت افزایش سطح miR-455 در خون باشد. از آنجایی که تشخیص زودهنگام بیماری آلزامیر در مراحل اول که بیمار فاقد علائم بالینی است در

جهت پیشگیری از بروز علائم بالینی، درمان و یا کنترل پیشرفت آن در حال حاضر مهم‌ترین هدف درمانی بیماری آلزامیر است، معتقدیم این یافته از مطالعه‌ی حاضر می‌تواند miR-455 را به‌عنوان یک مارکر مهم تشخیصی برای بیماری آلزامیر معرفی نماید. اگرچه مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سطح miR-455 با شدت بیماری آلزامیر ارتباط ندارد، اما آخرین مطالعه‌ی کومار و همکاران (۱۸) که در سال ۲۰۱۹ با هدف استفاده از مارکر miR-455 در جهت درمان بیماری آلزامیر انجام شد، نشان داد که مداخله در ژنوم miR-455 ممکن است باعث ایجاد یک روند درمانی در بیماری گردد و می‌توان از این افزایش شدید miR-455 در بیماری آلزامیر بر علیه بیماری استفاده کرد. تمامی این مطالعات انجام شده همه تایید کننده نتیجه‌ی به‌دست‌آمده در مطالعه‌ی ما مبنی بر افزایش سطح miR-455 در بیماران مبتلا به آلزامیر بود و همانند مطالعه‌ی حاضر استفاده از miR-455 به‌عنوان یک مارکر تشخیصی زودهنگام بیماری آلزامیر را تایید می‌کنند.

در مطالعه‌ای که توسط هانگ و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۱۷ در شهر گوانژو کشور چین انجام شد، بیماری آلزامیر در تعدادی موش ترانس ژنتیک APP/PS1 القا شد. موش‌ها در دو گروه مبتلا به سطح بالای آلزامیر و گروه کنترل تقسیم شدند. نتایج مطالعه‌ی هانگ و همکاران (۱۹) نشان داد که سطح miR-125، miR-9 و miR-191 در موش‌های مبتلا به آلزامیر به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود. این یافته در تضاد با نتیجه به‌دست‌آمده در مطالعه‌ی حاضر مبنی بر افزایش سطح miR-125 در نمونه سرمی بیماران مبتلا به آلزامیر بود.

در مطالعه‌ای که تان و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۳ در کشور چین با هدف بررسی miR-125 به‌عنوان یک مارکر تشخیصی بیماری آلزامیر انجام دادند، نمونه سرم ۱۰۵ بیمار مبتلا به آلزامیر و ۱۵۰ فرد سالم از نظر سطح miR-125 مقایسه گردید. میانگین سنی بیماران مبتلا به آلزامیر ۷۱/۶۴ سال و میانگین سنی گروه کنترل ۷۲/۶۵ سال بوده و عمده شرکت‌کنندگان را مردان تشکیل داده بودند.

مرحله بیماری نمونه‌های استفاده شده در مطالعات مختلف امکان مقایسه دقیق نتایج به دست آمده و به تبع تعمیم نتایج به جامعه را کاهش می‌دهد. نکته‌ای که مطالعه‌ی ژانگ و همکاران نیز به طور خاص به آن اشاره کرده است. بنابراین، همچنان به نظر می‌رسد که نیاز به انجام مطالعات بیشتر و دقیق‌تر در خصوص تغییرات miR ها در بیماری آلزامر با حجم نمونه بالاتر مورد نیاز باشد.

از آن جایی که این پژوهش تنها در یک مرکز انجام شده بود بنابراین کمبود حجم نمونه با توجه به محدودیت زمانی، از محدودیت‌های اصلی این مطالعه بود. به طوری که در صورت وجود چندین مرکز با مراجعه‌کنندگان بیشتر، احتمالاً نتایج با تعمیم بیشتر قابل بحث بود.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد بیان ژن‌های miR-125 و miR-455 در بیماران مبتلا به آلزامر به طور معناداری افزایش یافت. اما با شدت بیماری ارتباط معناداری نداشت. همچنین بین شدت بیان miR-125 و miR-455 با سن بیماران، جنسیت بیماران، طول مدت بیماری و سابقه‌ی خانوادگی ابتلا به آلزامر ارتباطی مشاهده نشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه از حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات نوآوری دانشکده پزشکی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### تعارض منافع

در این تحقیق هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

### ملاحظات اخلاقی و کد اخلاق

در این مطالعه سعی شد پروتکول آیین‌نامه اخلاقی رعایت شود به طوری که اطلاعات موجود در چک‌لیست‌ها کاملاً محفوظ باقی ماند. قبل از انجام طرح از افراد وارد شده به طرح رضایت‌نامه آگاهانه گرفته شد. هیچگونه هزینه اضافی به بیماران تحمیل نگردید. این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.NEYSHABUR.REC.1399.010 در

میانگین سطح miR-125 در گروه کنترل و گروه مبتلا به آلزامر به ترتیب ۸/۴۶ و ۱۳/۰۶ بود، که سطح miR-125 در گروه مبتلا به آلزامر به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود. نتایج این مطالعه هم‌راستا و منطبق با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر بود و نشان داد که سطح miR-125 می‌تواند در بیماری آلزامر افزایش پیدا کند. اگرچه نتایج مطالعه‌ی تان و همکاران (۲۰) هم‌راستا و منطبق با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر بود؛ اما به طور کلی این نتیجه بر خلاف نتایج کلی مطرح شده در مطالعات دیگر همانند مطالعه‌ی هانگ و همکاران (۱۹) یا لوگلی و همکاران (۲۱) بود، زیرا سایر مطالعات عنوان کرده اند که سطح miR-125 در بیماران مبتلا به آلزامر به طور معناداری کاهش پیدا می‌کند. علت عمده اختلاف نتایج مطالعات در این خصوص وابستگی سطح miR-125 و سایر miR ها به عوامل مختلف است. مطالعه‌ی ژانگ و همکاران (۱۳) در سال ۲۰۲۱ انجام دادند، جدیدترین متاآنالیز منتشر شده در حوضه نقش و استفاده از miR ها در بیماری آلزامر است که نتایج تمام مطالعات انجام شده در این حوزه را بررسی و مقایسه کردند. این مطالعه نیز در خصوص تغییرات miR-125 در بیماری آلزامر، بیان می‌کند که سطح این مارکر در بیماران مبتلا به طور معناداری کاهش پیدا کرده است؛ اما در تحلیل نتایج متاآنالیز خود عنوان می‌کند که سطح هر یک از miR ها تنها به وجود و شدت یک بیماری بستگی ندارد، بلکه متأثر از عوامل مختلفی مانند ژنتیک، محیط، قومیت، شاخص توده بدنی، سن، جنسیت، سایر بیماری‌های کشف نشده در بیمار، شدت بیماری در نمونه‌های بررسی شده و تفاوت‌های نمونه‌گیری است. بنابراین ممکن است که در خصوص یک miR خاص نتایج متفاوتی مشاهده شود. به همین دلیل استفاده از یک miR به تنهایی برای بررسی بیماری مانند آلزامر توصیه نمی‌شود، بلکه استفاده از چندین مارکر مختلف در کنار یکدیگر توصیه گردید. این مطالعه همچنین با بررسی نتایج مطالعات انجام شده توصیه کرده است که سایر مطالعات به جای استفاده از نمونه سرم از نمونه پلاسمای بیماران استفاده کنند. از طرف دیگر حجم نمونه پایین مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات از یک سو و تفاوت



دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد تصویب شد.

## References:

1. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. 2010;6(3):131-44.
2. Cummings JL. Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Alzheimer's & Dementia*. 2011;7(3):e13-e44.
3. Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, Trojanowski JQ, Montine TJ, Jeromin A, et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2014;10(1):115-31.
4. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.
5. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*. 2009;136(2):215-33.
6. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(30):10513-8.
7. Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental neurology*. 2012;235(2):491-6.
8. Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PloS one*. 2013;8(7):e69807.
9. Sheinerman KS, Tsivinsky VG, Abdullah L, Crawford F, Umansky SR. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: biomarker validation study. *Aging*. 2013;5(12):925-38.
10. Geekiyanage H, Chan C. MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid  $\beta$ , novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(41):14820-30.
11. Hébert SS, Horré K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN, et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ $\beta$ -secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(17):6415-20.
12. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Disease-a-month: DM*. 2010;56(9):484.
13. Zhang W, Zhang G, Gao S. The potential diagnostic accuracy of circulating microRNAs for Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurologia*. 2021.
14. Maes OC, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM. MicroRNA: implications for Alzheimer disease and other human CNS disorders. *Current genomics*. 2009;10(3):154-68.
15. Cai J, Zuo X, Chen Z, Zhang Y, Wang J, Wang J, et al. Long noncoding RNAs serve as potential diagnostic biomarkers for colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2019;10(3):611.
16. Kumar S, Reddy PH. MicroRNA-455-3p as a potential biomarker for Alzheimer's disease: an update. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:41.
17. Kumar S, Vijayan M, Reddy PH. MicroRNA-455-3p as a potential peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*. 2017;26(19):3808-22.
18. Kumar S, Reddy PH. A new discovery of MicroRNA-455-3p in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019;72(s1):S117-S30.
19. Hong H, Li Y, Su B. Identification of circulating miR-125b as a potential biomarker of Alzheimer's disease in APP/PS1 transgenic mouse. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;59(4):1449-58.
20. Tan L, Yu J-T, Liu Q-Y, Tan M-S, Zhang W, Hu N, et al. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*. 2014;336(1-2):52-6.
21. Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, Fields CJ, Hernandez AG, et al. Plasma exosomal miRNAs in persons with and without Alzheimer disease: altered expression and prospects for biomarkers. *PloS one*. 2015;10(10):e0139233.



## Investigating the Relationship between miR-125-b and miR-455-3p Gene Expression and the Severity of Alzheimer's Disease

Mohammad Reza Khakzad<sup>1,2\*</sup>, Maryam Gohari<sup>1</sup>, Faezeh Bastan<sup>1</sup>, Ali Reza Hashemi<sup>3</sup>,  
Seyed Mehran Homam<sup>3</sup>, Tayebbeh Rabani nia<sup>1,4</sup>

1. Innovative Medical Research Centre, MMS.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Department of Immunology, MMS.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran
3. Department of neurology, MMS.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran
4. Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

### Type of Article Original Research

Received: 2024/11/11

Accepted: 2025/06/07

**\*Corresponding Author:**  
**Mohammad Reza Khakzad,**  
Innovative Medical  
Research Centre, MMS.C.,  
Islamic Azad University,  
Mashhad, Iran

TEL: 09151176352

Email: (mr.khakzad@iau.ac.ir)

### Abstract

**Introduction:** Alzheimer's disease is the most common type of dementia, and as of now, there has not been a non-invasive method known for its preclinical diagnosis. In recent years, there have been several studies highlighting the role of miR-125 and miR-455 as effective factors in genes related to the pathogenesis of Alzheimer's disease. In this study, the relationship between gene expression levels of these two miRNAs and the severity of Alzheimer's clinical symptoms in patients with Alzheimer's disease was investigated.

**Methods:** 50 Patients with Alzheimer's were identified according to the DSM-5 criteria and the severity of the disease was evaluated with the Mini-Mental State Examination (MMSE) and the Roland Dementia Assessment Scale (RUDAS). Venous blood was drawn from the patients/ Venous blood samples were collected from the patients and peripheral blood mononuclear cells were isolated. MicroRNAs were extracted using a specific kit, cDNA was synthesized, and the expression levels of miR-125 and miR-455 were measured by using the PCR-RT method.

**Results:** Patients had a mean age of  $76.00 \pm 7.73$  years, including 54% men, were studied. A mean frequency of  $3.68 \pm 2.84$  and  $5.89 \pm 4.69$  was calculated for gene expression levels of miR-125 and miR-455, respectively, which was significantly higher than that of the control population ( $P < 0.05$ ). Despite that, there was no significant correlation between the gene expression levels and the severity of the disease. In addition, age, gender, and the duration of the disease were not associated with the gene expression levels analyzed in this study.

**Conclusion:** The expression of miR-125 and miR-455 genes is significantly higher in patients with Alzheimer's disease; however, it was not related to the severity of the disease. It is suggested that future studies focus more on the markers related to these molecules in intracellular pathways.

**Keywords:** Alzheimer's disease, MMSE, miR-125 and miR-455, Gene Expression

► Please cite this article as: Khakzad M. R, Gohari M, Bastan F, Hashemi A.R, Homam S. M, Rabani nia T. Investigating the Relationship between miR-125-b and miR-455-3p Gene Expression and the Severity of Alzheimer's Disease. J Neyshabur Univ Med Sci 2024;12(1):56-65.