

بررسی بیان ژن COX5B در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس

جمشید مطاعی^{۱*}، میترا عطایی^۱، محبوبه اکبری چلاری^۲، سیدمسعود نبوی^۳، محمدعلی صحراییان^۴، محمدحسین صنعتی^۱

۱. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - گروه ژنتیک پزشکی ۲. دانشگاه تربیت معلم تبریز ۳. دانشگاه شاهد ۴. دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده/ مالتیپل اسکلروزیس نوعی بیماری خود ایمنی، التهابی و تحلیل برنده نورون هاست. نقص در تأمین انرژی توسط میتوکندری ممکن است بر میلینه شدن و التهاب در نورون‌ها و بافت‌های که تحت تأثیر مالتیپل اسکلروزیس هستند اثر بگذارد. نورونها و ماهیچه‌ها وابستگی زیادی به تأمین انرژی توسط متابولیسم اکسیداتیو دارند لذا بدین دلیل ضعف ماهیچه‌ها در مالتیپل اسکلروزیس دیده می‌شود. در این تحقیق ۵۳ فرد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و ۴۹ فرد سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج RNA از خون بیماران و افراد سالم و سنتز cDNA، بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. کاهش بیان ژن COX5B در بیماران نسبت به افراد سالم مشاهده شد. کاهش بیان در سطح رونویسی این ژن ممکن است منجر به افزایش گونه‌های اکسیژن فعال، از دست دادن هموستازی یون کلسیم و آپوپتوز می‌شود. بنابراین کاهش بیان پروتئین‌های میتوکندری این فرضیه را تقویت می‌بخشد که ناهمخوانی بین تقاضای انرژی و کاهش تولید ATP باعث دمیلمینه شدن آکسون‌ها در بیماران مالتیپل اسکلروزیس می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از این پروژه تحقیقاتی پیش بینی می‌شود که بتوان از این ژن به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص زود هنگام بیماری مالتیپل اسکلروزیس استفاده کرد. بدیهی است که برای رسیدن به این هدف نیاز به تحقیقات تکمیلی می‌باشد.

واژگان کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، ژن COX5B و بیومارکر.

به بروز اختلال در انتقال پیام‌های عصبی می‌گردد (۱،۲). مطالعات خانواده‌ها و دوقلوها نشان داده که ژنتیک یک عامل اساسی در بروز ام اس می‌باشد شیوع این بیماری در میان افراد درجه اول ۲۰-۴۰ برابر بیشتر از شیوع آن در جمعیت عمومی است. نرخ تطابق بیشتر برای دوقلوهای همسان (۲۵-۳۴ درصد) نسبت به دوقلوهای ناهمسان (۲-۵ درصد) نشان دهنده توارث پذیری بالا است (۳). هر چند فاکتورهایی که به طور دقیق باعث بیماری ام اس می‌شوند مشخص نمی‌باشند. اما فاکتورهای زیر ممکن است باعث رشد و توسعه بیماری ام اس گردند از جمله نقص در DNA هسته و میتوکندری، عفونت‌های ویروسی، هیپوکسی، استرس اکسیداتیو، فقدان نور یا سطح پایین ویتامین D و افزایش ماکروفاژها (میکرو گلیاها) و لنفوسیت‌ها در مغز (۲).

مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (ام اس) نوعی بیماری مزمن و اغلب پیش رونده ماده سفید دستگاه عصبی مرکزی (مغز، نخاع و عصب بینایی) می‌باشد که بندرت ممکن است اعصاب محیطی را نیز درگیر نماید. این بیماری با تخریب غشای میلین برخی از اعصاب مناطق فوق الذکر به صورت تکه‌های کوچک مشخص می‌شود. از بین رفتن غلاف میلین منجر

* جمشید مطاعی، دانشجوی کارشناسی ارشد

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - گروه ژنتیک پزشکی

پست الکترونیک: Roxana_kariminejad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۴/۱۷ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۶/۲۵

کاهش فعالیت زنجیره تنفسی میتوکندریایی در بسیاری از بیماریهای نورودژنراتیو از جمله آلزایمر، پارکینسون، ام اس گزارش شده است (۴-۶). در مطالعات متعددی به نقص های میتوکندری در بیماری مالتیپل اسکلروزیس اشاره شده است از جمله کاهش N- استیل اسپاراتات^۱ (NAA) به عنوان متابولیک میتوکندریایی (۷)، که غلظت آن در حالت طبیعی در نوروها بالا می باشد. اما با مهار زنجیره انتقال الکترون کاهش می یابد (۸)، کاهش متابولیسم انرژی در موش انسفالومیلیت اتو ایمن تجربی^۲ (EAE) به عنوان مدل موشی ام اس (۹ و ۱۰)، و کاهش در بیان و عملکرد ژن های زنجیره انتقال الکترون در کورتکس مغز (۱۱). اثر طرفی شباهتهای علایم بالینی در اختلالات میتوکندریایی با بیماری ام اس (خستگی، اختلال بینایی، سردرد، کاهش شنوایی، تشنج، آتاکسی و فراموشی) دلیلی بر ارتباط نزدیک اختلالات میتوکندریایی با بیماری ام اس می باشد (۱۲).

میتوکندری نقش مهمی در تولید ATP، هموستازی کلسیم و آپوپتوز دارد (۱۳). زنجیره تنفسی در غشاء داخلی میتوکندری قرار گرفته و از چهار کمپلکس (کمپلکس I-IV) و کمپلکس V یا ATP سنتاز تشکیل شده است (۱۴). ۹۰ درصد اکسیژن در کمپلکس IV یا سیتوکروم C اکسیداز (COX) مصرف می شود. سیتوکروم C اکسیداز آخرین جزء زنجیره انتقال الکترون می باشد که انتقال الکترون اثر سیتوکروم C به اکسیژن انتقال می دهد. این آنزیم در پستانداران از ۱۳ زیرواحد تشکیل شده است زیرواحدهای کاتالیتیک بزرگ (COX1, COX2, COX3) توسط ژنوم میتوکندری کد می شوند و زیرواحدهای ساختاری کوچک که اطراف هسته آنزیم احاطه می کنند توسط ژنوم هسته (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C, COX8) کد می شوند. در پستانداران تا به حال ایزوفرمی برای COX5b پیدا نشده، زیرواحد COX5b برای جمع شدن

و پایداری کمپلکس IV مورد نیاز است (۱۵).

در این پژوهش میزان بیان ژن COX5B در خون ۵۳ فرد بیماری و ۴۹ فرد سالم به عنوان شاهد اندازه گیری و مقایسه گردید. هدف ما در این تحقیق بررسی میزان بیان این ژن در بیماران مبتلا به ام اس می باشد تا در صورت تغییر بیان بتوان اثر این ژن به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص زود هنگام بیماری ام اس استفاده کرد. تحقیق حاضر اولین تحقیق در نوع خود بوده که به بررسی ارتباط بین بیان ژن COX5B و بیماری ام اس می پردازد.

مواد و روشها

نمونه گیری:

بعد از اخذ رضایت نامه کتبی آگاهانه اثر بیماران و افراد سالم بر طبق رهنمود اخلاقی اثر پژوهشگاه ملی مهندسی شرنیتیک و زیست فناوری نمونه گیری انجام شد. ابتدا بیماران توسط تست های تکمیلی و تشخیصی متخصص مربوطه تأیید شدند. افراد سالم از میان افرادی انتخاب شدند که هیچ گونه سابقه خانوادگی بیماری ام اس نداشتند، سالم بودن آنها توسط نورولوژیست تأیید شدند. نمونه گیری اثر هر دو گروه در مرکز تحقیقات ام اس بیمارستان سینا وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت گرفت. مقدار ۳ سی سی از خون وریدی به فالكون حاوی ۵۰۰ میکرولیتر EDTA، M ۰/۰۵ منتقل و به آرامی تکان داده می شود تا EDTA و خون با هم مخلوط شوند و EDTA مانع از لخته شدن خون شود (مقدار ۱۰۰ میکرولیتر EDTA، M ۰/۰۵ به ازای هر سی سی خون لازم است). افراد مبتلا به ام اس از میان بیمارانی انتخاب می شوند که به تشخیص نورولوژیست دارای نوع بالینی RRMS یا SPMS یا PPMS یا Devic بودند (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات آماری و بالینی بیماران و افراد سالم (کنترل).

افراد سالم	بیماران ام اس	خصوصیات
	۳۴ نفر، ۶۴/۱۵ (% RRMS) ، ۳ نفر، ۵/۶۶ (% PPMS): ۱۳ نفر، ۲۴/۵۳ (% SPMS): ۳ نفر، ۵/۶۶ (% Devic):	نوع بالینی بیماری (تعداد و درصد افراد)
۲۶ ± ۱/۴۳	۳۵/۰۶ ± ۹/۳۵	میانگین سن (سال)
۳۳ زن ۱۶ مرد	۳۷ زن ۱۶ مرد، ۶۹/۸ درصد زن ۳۰/۲ درصد مرد	جنسیت (تعداد و درصد)
۶۷/۳ درصد زن ۳۲/۷ درصد مرد	۶/۳۴ ± ۳/۶	
	۶/۱ ± ۲/۵ (% RRMS) ، ۱۰/۵ ± ۶/۴ (% PPMS): ۳/۱ ± ۸/۷ (% PPMS) ، ۲/۴ ± ۱/۶ (% Devic):	طول دوره بیماری در کل بیماران به سال طول دوره بیماری در هر مرحله به سال

1. N- acetyl aspartate

2. experimental autoimmune encephalomyelitis

با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی و توسط شرکت فناوران سنتز شد (جدول ۲). دمای اتصال برای دو ژن بتا اکتین و COX5B به ترتیب ۵۸ و ۶۷ درجه سانتیگراد بود. اختصاصیت پرایمر و عدم آلودگی به DNA ژنومی توسط پیک منحنی ذوب اختصاصی (۹۱ و ۹۰ درجه سانتیگراد به ترتیب برای شرن‌های COX5B و بتا اکتین) و همچنین اندازه محصولات RT-PCR با الکتروفورز با ژل ۱/۵٪ تأیید شد (شکل ۱). در این تحقیق از SYBR Green I به عنوان مرنگ فلورسانت و دستگاه Light-Cycler مربوط به شرکت Roch به کار رفته است. SYBR Green به شیار کوچک DNA دورشته‌ای متصل می‌شود.

آنالیز آماری:

پس از به دست آوردن Ct هر دو ژن بتا اکتین و COX5B برای تمام نمونه‌ها و محاسبه Ct (حاصل تفریق Ct شرن COX5B از Ct ژن بتا اکتین) برای هر یک از آنها با استفاده از نرم افزار SPSS و به کار بردن آزمون t-test، داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA:

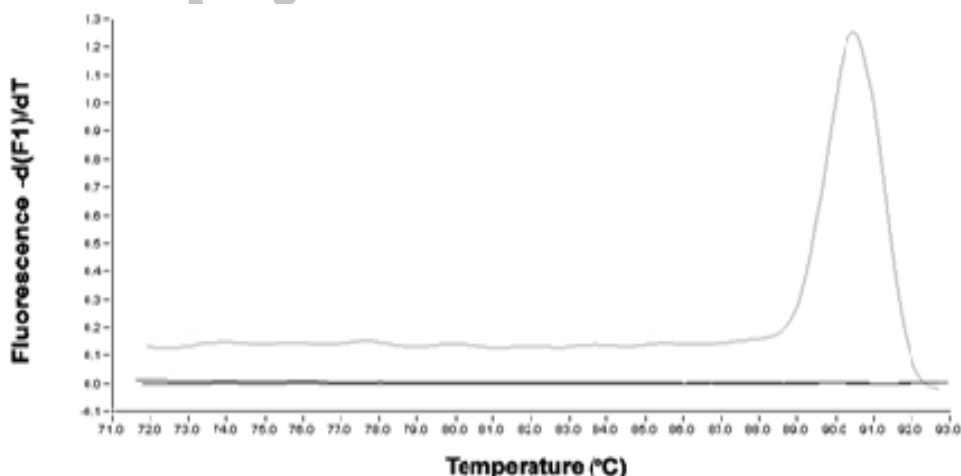
استخراج RNA از خون طبق پروتوکول کیت Rosch انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و طبق دستورالعمل کیت فرمانتاز انجام گردید. الیگو dT₁₈ به عنوان پرایمر در رونویسی معکوس استفاده شد. این کیت مجموعه‌ای کامل برای سنتز اولین رشته cDNA از روی الگوی mRNA یا RNA کل سلولی می‌باشد. کل واکنش در حجم ۲۰ میکرو لیتر در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد برای غیرفعال کردن آنزیم انجام شد. در انتهای این مرحله کل cDNA تک رشته‌ای حاصل می‌شود و با خاصیت RNase موجود در آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، RNA نیز حذف می‌شود.

Real Time PCR:

Real Time PCR میزان قطعه تولید شده را در طول هر سیکل از تکثیر (باسنجش فلورسانت) اندازه‌گیری می‌کند. Real-Time PCR با استفاده از ۵mM پرایمر اختصاصی برای دو ژن بتا اکتین (ژن رفرنس) و COX5B

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعات آنها.

نام ژن	توالی پرایمر	طول قطعه
بتا اکتین	F: 5'-AGACGCAGGATGGCATGGG -3' R: 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC -3'	۱۶۱
COX5B	F: 5'- GCTGCATCTGTGAAGAGGACAATAC -3' R: 5'-AATTTAGTCAGGTGCTCAGTGTG -3'	۱۳۸



شکل ۱: پیک ذوب محصول ژن COX5B. این نمودار بر اساس منحنی ذوب رسم شده و موقعیت پیک موجود در آن نشان دهنده دمای Tm محصول ژن COX5B می‌باشد (Tm=۹۱).

نتایج

در این تحقیق کاهش بیان ژن COX5B در سطح رونویسی در خون افراد بیمار نسبت به افراد سالم به طور معنی داری مشاهده شد. زیرا مقدار ارزش P به دست آمده از این آنالیز آماری ۰/۰۴۳ است که این مقدار کمتر از ۰/۰۵ است و کاهش بیان دیده شده به لحاظ آماری معنی دار است. با استفاده از قانون لیواک یا $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان این کاهش بیان را محاسبه می‌کنیم (۱۶):

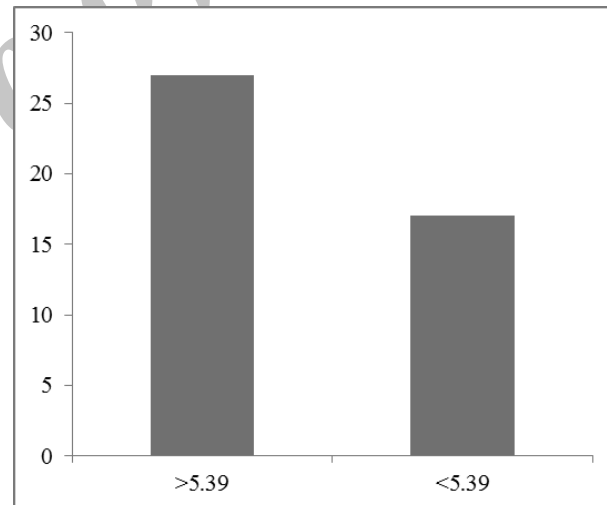
$$\Delta Ct_t (\text{بیمار}) = Ct_t (\text{ژن هدف}) - Ct_t (\text{ژن بتا اکتین})$$

$$\Delta Ct_t (\text{نرمال}) = Ct_t (\text{ژن هدف}) - Ct_t (\text{ژن بتا اکتین})$$

$$\Delta\Delta Ct_t = \Delta Ct_t (\text{نرمال}) - \Delta Ct_t (\text{بیمار})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct_t} = 2^{-(5/39 - 6/06)} = 1/59$$

در این فرمول اخر میانگین ΔCt_t به دست آمده استفاده شده است. میزان این کاهش بیان با استفاده از قانون لیواک $2^{-\Delta\Delta Ct_t}$ برابر با ۱/۵۹ می‌باشد (۱۶). این نتیجه نشان می‌دهد که بیان ژن در افراد سالم به



شکل ۲: نمودار درصد نمونه‌های بیماری که دارای Ct بالاتری از میانگین Ct کنترل هستند. بنابراین نمودار ۶۱/۳۶٪ بیماران دارای Ct بیشتری از میانگین Ct کنترل (۵/۳۹) هستند و ۳۸/۶۴٪ بیماران دارای Ct کمتری از میانگین Ct کنترل هستند.

میزان ۱/۵۹ برابر نسبت به افراد بیمار بیشتر است. همچنین ۶۱/۳۶٪ بیماران دارای Ct بیشتری اخر میانگین Ct کنترل هستند و ۳۸/۶۴٪ بیماران دارای Ct کمتری از میانگین Ct کنترل هستند (شکل ۲).

بحث

کاهش فعالیت زنجیره تنفسی میتوکندریایی در بسیاری از بیماریهای نورودژنراتیو از جمله آلزایمر، پارکینسون، و ام اس گزارش شده است (۴-۶). از طرفی شباهتهای علایم بالینی در اختلالات میتوکندریایی با بیماری ام اس دلیلی بر ارتباط نزدیک اختلالات میتوکندریایی با بیماری ام اس می‌باشد (۱۲).

دکتر فاضلی و همکاران، با بررسی پروتئومیکس سیستم عصبی مرکزی موش سالم و EAE کاهش بیان در ۵ پروتئین زنجیره تنفسی میتوکندری (Cox5a, Cox5b, Ndufv2, Ndufs8, ATP5b) مشاهده کردند (۱۰). در این تحقیق میزان بیان ژن COX5B در خون ۵۳ فرد مبتلا به ام اس و ۴۹ فرد سالم به عنوان گروه شاهد اندازه‌گیری و مقایسه گردید. نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن در بیماران نسبت به افراد سالم کاهش دارد. لذا تحقیق حاضر، مطالعه صورت گرفته توسط دکتر فاضلی را تایید می‌کند.

سیتوکروم c اکسیداز یک سایت مهم تنظیم فسفریلاسیون اکسیداتیو و تولید ATP در میتوکندری است (۱۵). اکثراً ATP بوسیله زنجیره انتقال الکترون در غشاء داخلی میتوکندری تولید می‌شود. تولید ATP بوسیله میتوکندری نقش مهمی در هموستازی کلسیم، آپوپتوز و تولید رادیکال‌های ازاد در سلول دارد. مهار کمپلکس IV بوسیله اسید نیتریک یا سیانید باعث مهار انتقال جریان عصبی و تجزیه اکسون‌ها می‌شود (۱۳ و ۱۶). در یک مطالعه افزایش میتوکندری و فعالیت کمپلکس IV در مناطق دمیلینه شده مزمن در ام اس در مقایسه با اکسون‌های میلینه در مغز و نخاع مشاهده شد (۱۸)، که ممکن است یک واکنش جبرانی به افزایش درخواست انرژی در اکسون‌های دمیلینه شده مزمن باشد.

نقص در فعالیت کمپلکس IV ممکن است نقش مهمی در تحلیل اکسون‌ها داشته باشد. در مدل موشی هیپومیلینه، که برای ژن پروتئین پایه میلین سرکوب^۲ شده بود، فعالیت کمپلکس IV همراه با افزایش تراکم میتوکندری بالا رفت (۱۹). این مدل حیوانی ارتباط بین اختلال در میلین و تغییرات انرژی مورد نیاز نشان می‌دهند. نقص میتوکندری ممکن است به دلیل عدم تامین انرژی مورد نیاز اکسون دمیلینه و یا اثرات سمی میتوکندری باشد. در یک مطالعه با استفاده از siRNA بر علیه COX5b در سلول‌های هلا-۸۰^۴ افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال^۵ (ROS) توسط میتوکندری و کاهش فعالیت COX مشاهده شد. همچنین بیان بالای COX5b با کاهش تولید ROS در سلول‌های

می‌یابد (۲۶).

بیان ژن COX5B در سطح رونویسی بوسیله میکروآرای گزارش شده است (۱۵). همچنین آنالیز پروتئوم در کورتکس بیماران ام اس در مقایسه با افراد سالم بیان متمایز این ژن نشان داد. از دست دادن این زیرواحد نقش مهمی در نقص میتوکندری دارد از آنجا که وجود آن برای تجمع و عملکرد COX لازم است. در مجموع نقص کمپلکس IV سبب کاهش در تولید ATP و تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۷). بنابراین ما در این تحقیق کاهش بیان ژن COX5B در سطح رونویسی بوسیله qPCR در خون بیماران ام اس در مقایسه با افراد سالم مشاهده کردیم. کاهش رونویسی این ژن ممکن است منجر به کاهش تولید انرژی، افزایش ROS، از دست دادن هموستازی یون کلسیم و آپوپتوز یا نکروز سلول شود (۲۸). در ام اس این فرایندها بوسیله دمیلینه شدن اکسون‌ها همراه با افزایش در خواست انرژی برای نگهداری هموستاز یون از طریق پمپ سدیم-پتاسیم ATP از در نوروها تسریع می‌شود (۲۹). با در نظر گرفتن مطالب فوق پیشنهادات زیر به منظوری ادامه و گسترش این طرح تحقیقی تقدیم می‌گردد: بررسی میزان پروتئین کد شونده توسط این ژن در سرم افراد مبتلا به ام اس و بررسی ارتباط این پروتئین با شدت بیماری و همچنین بررسی کاهش بیان mRNA پروتئین‌های میتوکندریایی در آنالیز میکروآرای بافت خون بیماران مبتلا به ام اس جهت تعیین دسته‌های اثر بیومارکرهای زیستی مختص خون محیطی که تشخیص را آسان‌تر و مطمئن‌تر می‌سازند.

نتیجه‌گیری

کاهش بیان ژن COX5B در سطح رونویسی در خون بیماران ام اس در مقایسه با افراد سالم ممکن است منجر به کاهش تولید انرژی، افزایش ROS، از دست دادن هموستازی یون کلسیم و آپوپتوز یا نکروز سلول شود و در نتیجه باعث دمیلینه شدن بیشتر اکسون‌ها و تخریب نوروها در بیماران ام اس می‌شود.

تقدیر و تشکر

بودجه‌ی مورد نیاز برای انجام این پروژه تحقیقاتی توسط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و خریست فناوری تامین گردید همچنین کمال تشکر از پرسنل مرکز تحقیقات ام اس بیمارستان سینا و تمامی بیمارانی که در پیشبرد این پروژه به ما یاری رساندند.

طبیعی هلا-۸۰ همراه است (۱۵). در یک تحقیق دیگر نقش زیر واحد COX5b در عملکرد/فعالیت با استفاده از سویه‌های سلولی ماکروفاژ RAW۲۴۶,۷ بدست آمد که در آن siRNA برای mRNA ژن COX5b به طور پایدار بیان شده بود، کاهش قابل ملاحظه هولوآنزیم (COX) و فعالیت آن، اثر دست دادن پتانسیل غشاء و تولید کم‌تر ATP مشاهده شد (۱۵). سویه‌های مخمر فاقد زیر واحد IV، همولوگ زیر واحد COX5b در پستانداران، کمپلکس COX تشکیل نشد (۲۰ و ۲۱). بنابراین زیرواحد COX5b ممکن است نقش مهمی در جمع شدن و فعالیت کمپلکس IV داشته باشد.

نقص کمپلکس IV در اکسون و در آسیب الگوی III بیماری ام اس ممکن باعث تجزیه اکسون‌ها از طریق افزایش غلظت سدیم درون سلولی و عدم تعادل کلسیم شود. ویژگی بارز آسیب الگوی III شامل آپوپتوز وسیع الیگودندروسیت‌ها و آسیب بافتی شبه هیپوکسی می‌باشد (۱۴). همچنین تخریب ترجیحی اکسون‌های نازک در مقایسه با اکسون‌های ضخیم در ام اس نشان دهنده نقص انرژی به عنوان مکانیسم مهمی در تحلیل اکسون‌ها می‌باشد (۲۲). سطح کمتر نسبت به انرژی یا کاهش نسبت انرژی به یون در اکسون نازک (کوچک) ممکن نشان دهنده آسیب پذیری بیشتر این اکسون‌ها نسبت به اختلال در تولید انرژی می‌باشد. اکسون کوچک قطر کمتر از ۲,۳-۳,۳ mm دارند. در سال ۱۹۶۰، Hodgkin و همکارانش کمپلکس IV به عنوان جزء اصلی خارج کردن سدیم توسط پمپ سدیم-پتاسیم و حفظ پتانسیل استراحت غشاء شناسایی کردند. بدنال دمیلینه شدن، کانال سدیم از گره رانویر به کل غشاء اکسون دمیلینه شده توزیع می‌شود، کانال سدیم جدید وارد گره رانویر می‌شوند که این نیازمند ATP بیشتر برای حفظ پتانسیل فعال می‌باشد که تحت کنترل پمپ سدیم-پتاسیم است. افزایش ورود سدیم به درون سلول در اثر عملکرد این کانال باعث برعکس شدن کانال سدیم-کلسیم می‌شود که در آن کلسیم وارد سلول و سدیم خارج می‌شود. این کانال در حالت عادی سه یون سدیم وارد سلول و یک یون کلسیم خارج می‌کند. افزایش غلظت کلسیم درون سلولی باعث دپلیمیریزاسیون میکروتوبول‌ها (۲۳) و فعال شدن پروتئازهای تجزیه کننده میکروفیلانمت‌ها می‌شود (۲۴ و ۲۵). در نتیجه منجر به تحلیل اکسون دمیلینه می‌شود (۱۹). عدم تعادل بین نیاز به انرژی و کاهش تولید ATP تولید شده در اکسون باعث تحلیل اکسون دمیلینه شده مزمن در بیماران ام اس می‌شود. نیازی به انرژی هنگام توزیع دوباره کانال سدیم در اکسوپلاسم دمیلینه شده افزایش

References / منابع

1. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment, *Autoimmunity Reviews* 2010;9: 387–394.
2. Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1802: 66–79.
3. Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, et al. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis, *Seminars in Immunology* 2009; 21: 328–333.
4. Horssten JV, Maarten EW, Schreibelt G, et al. Radical change in Multiple sclerosis pathogenesis, *BBA- Mol. Basis Dis.* 2011; 1812: 141- 150.
5. Zhu J, Chu CT. Mitochondrial dysfunction in Parkinson, s disease, *J. Alzheimer's Disc.* 2012; 20: 325- 334.
6. Filippo MD, Chiasserini M, Picconi B, et al. Mitochondria and the link between neuroinflammation and neurodegeneration, *J. Alzeimers Disc* 2010; 20: 369- 379.
7. Gonen O, Catalaa I, Babb JS, et al. Total brain N -acetylaspartate: a new measure of disease load in MS. *Neurology* 2000;54: 15-9.
8. Clark JB. N- acetyl aspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction. *Dev Neurosic* 1998;20: 271-6.
9. Qi X, Lewin AS, Sun L, et al. Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Bio Chem* 2006; 281: 31950- 62.
10. Fazeli AS, Sanati MH, Nasrabadi D, et al. Central Nervous System Proteomics in Animal Model of Multiple Sclerosis Revealed Down- Regulation of Mithochondrial Proteins. *Proteomics*, 2010;10: 2822–2832.
11. Dutta R, McDonough J, Yin X, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 2006;59: 478–489.
12. Riordan-Eva P, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations *Journal of Medical Genetics* 1995;32: 81-87.
13. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003;348: 2656–68.
14. Mahad D, Lassmann H, and Turnbull D. Review Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis, *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2008;34: 577–589.
15. Galati D, Srinivasan S, Raza H, et al. Role of nuclear-encoded subunit Vb in the assembly and stability of cytochrome c oxidase complex: implications in mitochondrial dysfunction and ROS production. *Biochem J.* 2009;420: 439-49.
16. Kenneth JL, Thomas DS. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$ Method. *Methods* 2001;25: 402- 408.
17. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev* 2005;6: 389–402.
18. Don JM, Iryna Z, Graham C, et al. Mitochondrial changes within axons in multiple Sclerosis, *Brain* 2009: 132;1161–1174.
19. Andrews H, White K, Thomson C, et al. Increased axonal mitochondrial activity as an adaptation to myelin deficiency in the Shiverer mouse. *Journal of Neuroscience Research* 2006;83: 1533- 1539.
20. Glerum DM, Tzagoloff A, Submitochondrial distributions and stabilities of subunits 4, 5, and 6 of yeast cytochrome oxidase in assembly defective mutants. *FEBS Lett.* 1997;412: 410–414.
21. McEwen JE, Ko C, Kloeckner-Gruissem B. Nuclear functions required for cytochrome c oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of mutants in 34 complementation groups. *J. Biol. Chem.* 1986;261: 11872–11879.
22. Evangelou, N., Konz, D., Esiri, MM. Size selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Brain* 2001;124: 1813–1820.
23. O'Brien ET, Salmon ED, Erickson HP. How calcium causes microtubule depolymerization. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; 36: 125–135.
24. Jiang Q, Stys PK. Calpain inhibitors confer biochemical, but not electrophysiological, protection against anoxia in rat

- optic nerves. *J Neurochem* 2000;74: 2101–2107.
25. Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Na(+)-Ca²⁺ exchanger mediates Ca²⁺ influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter. *Ann. Neurol.* 1991;30: 375–380.
26. Lassmann H, Horssen JV. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Letters* 2011;585: 3715–3723.
27. Broadwater L, Pandit A, Clements R, et al. Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex, *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1812: 630- 641.
28. Celsi F, Pizzo P, Brini M, et al. Mitochondria calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration, *BBA- Bioenergetics* 2009; 1787: 335- 344.
29. Waxman SG. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels, *Nat Rev. Neurosci.* 2006;7: 932- 941.

Archive of SID