Original Article

Association of miR-146a rs2910164 Variant with Multiple Sclerosis Disease in Hamadan Province (Iran)

Novin Alamshah[1], Soyar Sari[1*], Reza Mirfakhraie[2]

[1]*Department of Cellular & Molecular Sciences, Faculty of Advanced Science & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

[2]*Department of Medical Genetics, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Soyar Sari,** Department of Cellular & Molecular Sciences, Faculty of Advanced Science & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: sari.s@iaups.ac.ir

Received: 25 May, 2017

Accepted: 25 Jul, 2017

Abstract

Background and Objectives: Multiple sclerosis disease (MS) is the most common autoimmune disease of the central nervous system among adolescence. Factors, such as environmental factors and genetic background are involved in the development of multiple sclerosis. Given that miRNAs play an important role in post-transcriptional regulatory levels in nerve cells and glial cells, thus, any change in their performance due to polymorphisms and eventually change in their expression level in the nervous system can pave the way for degenerative diseases, such as MS. In the present study, the role of miR-146a rs2910164 polymorphism, was investigated in the development of multiple sclerosis disease in the patients of Hamadan province.

Methods: In this case-control study, 150 patients with MS and 150 healthy individuals as control group, were selected. Genotyping was performed using Tetra ARMS PCR method. In the two study groups, Hardy-Weinberg equilibrium principle, was used to determine existence or absence of balance, Chi-square test was also used to determine the existence of relationship between the studied polymorphism and development of MS.

Results: No significant difference was observed in the distribution of dominant and recessive genotypes in patients with MS, as compared to healthy subjects.

Conclusion: Contrary to previous studies, the results of this study showed that there is no relationship between the polymorphism of miR146a rs2910164 and occurrence of MS.

Keywords: Multiple sclerosis; MicroRNAs; Polymorphism, Genetics.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره چهارم، تیر ۹۷
صفحه ۱۶ الی ۲۲

مقاله پژوهشی
(Original Article)

ارتباط واریانت miR-146a rs2910164 با بیماری مالتیپل‌اسکلروزیس، در استان همدان

نوین عالمشاه[۱]، سویار ساری[۱*]، رضا میرفخرایی[۲]

[۱]گروه 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.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
سویار ساری، گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
sari.s@iaups.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۶/۳/۴

تاریخ پذیرش:۹۶/۵/۷

چکیده

زمینه و هدف: بیماری مالتیپل‌اسکلروزیس (MS)، شایع‌ترین بیماری خودایمنی سیستم عصبی مرکزی در سنین جوانی است. فاکتورهایی همچون عوامل محیطی و زمینه ژنتیکی در ابتلا به بیماری مالتیپل‌اسکلروزیس دخیل هستند. از آنجا که miRNAها در سلول‌های عصبی و گلیال نقش مهمی در سطوح تنظیمی پس از رونویسی دارند؛ بنابراین تغییر در عملکرد آنها به‌واسطه پلی‌مورفیسم‌ها و درنهایت، تغییر بیان آن‌ها در سیستم عصبی می‌تواند زمینه را برای بیماری‌های تحلیل‌برنده اعصاب، ازجمله مالتیپل‌اسکلروزیس فراهم کند. در مطالعه حاضر نقش پلی‌مورفیسم miR146ars2910164 در ایجاد بیماری مالتیپل‌اسکلروزیس در بیماران استان همدان بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه مورد - شاهدی، ۱۵۰ بیمار مبتلا به مالتیپل‌اسکلروزیس و ۱۵۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. تعیین ژنوتیپ با روش Tetra ARMS PCR انجام گرفت. در دو گروه مورد بررسی جهت تعیین وجود تعادل یا عدم آن با قانون تعادل هاردی - واینبرگ، همچنین وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم مورد مطالعه و وقوع بیماری MS، از آزمون مربع کای استفاده شد.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری در توزیع ژنوتیپ در دو حالت توارث غالب و مغلوب در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد (برخلاف مطالعات پیشین)، ارتباطی بین پلی‌مورفیسم rs2910164 miR146a و بیماری MS وجود ندارد.

کلید واژه‌ها: مالتیپل اسکلروزیس؛ میکرو آر ان آ؛ چندشکلی، ژنتیک.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Alamshah N, Sari S, Mirfakhraie R. Association of miR-146a rs2910164 variant with multiple sclerosis disease in hamadan province (Iran). Qom Univ Med Sci J 2018;12(4):16-22. [Full Text in Persian]

مقدمه

مالتیپل‌اسکلروزیس (MS)، یک بیماری خودایمنی با التهاب مزمن غلاف میلین در سیستم عصبی مرکزی است که مجموعه‌ای از فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در ایجاد آن نقش دارند (۴-۱). طبق بررسی‌های صورت‌گرفته، بیماری MS در مناطق اروپای شمالی، آمریکا و شرق میانی نسبت به کشورهای دیگر شیوع بیشتری دارد (۹-۵). در دهه اخیر به‌طور نگران‌کننده‌ای، شیوع این بیماری در ایران رو به افزایش بوده و طبق گزارش‌ها میزان آن در زنان نسبت به مردان بیشتر بوده است (۱۴-۱۰). با توجه به اهمیت این بیماری و پژوهش‌های متعددی که بر روی پلی‌مورفیسم ژن‌های دخیل در ارتباط با این بیماری انجام شده، تاکنون مطالعات اندکی بر روی واریانت‌های miRNAها و ارتباط آن‌ها با بیماری MS صورت گرفته است (۱۶،۱۵). miRNAها گروه کوچکی از RNAهای غیرکدکننده و تک‌رشته‌ای هستند که طول آن‌ها بین ۲۴-۱۸ نوکلئوتید می‌باشد و در تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی نقش مهمی ایفا می‌کنند، همچنین آن‌ها با تجزیه و یا جلوگیری از ترجمه mRNA هدف، در جلوگیری از ایجاد بیماری‌ها نقش دارند (۱۹-۱۷). میکروRNAها معمولاً به کمک RNA پلیمراز II رونویسی‌شده و mRNA اولیه را به‌وجود می‌آورند، سپس از طریق پروتئین exportin5 از هسته به ماتریکس سیتوزولی منتقل و با شکسته‌شدن به‌وسیله آندوریبونوکلئاز Dicer به miR بالغ دورشته‌ای تبدیل و از طریق اتصال به ناحیه 3'UTR در mRNA هدف باعث عدم ترجمه آن می‌شوند و به این ترتیب از ایجاد بیماری جلوگیری می‌کنند. با توجه به اهمیت و نرخ شیوع بیماری و ارتباط آن با پلی‌مورفیسم میکروRNAها، بررسی واریانت‌های میکروRNAها در کشور ضروری به‌نظر می‌رسد، به‌طوری‌که miRNAها نقش مهمی در ایجاد بیماری‌ها و انواع سرطان‌ها دارند؛ به‌عنوان مثال Li و همکاران (سال ۲۰۱۴)، ارتباط پلی‌مورفیسم miRNA 146a- با بیماری چینی مبتلا به MS را بررسی کردند (۲۰). Ridolfi و همکاران (سال ۲۰۱۳) نیز ارتباط چندشکلی میکروRNA 23a و بیماری MS را با استفاده از Real time PCR در جمعیت ایتالیا (شامل ۳۹۹ بیمار و ۴۲۰ فرد به‌عنوان گروه کنترل) نشان دادند (۲۱). miR-146a، یکی از miRNAهای است که نقش آن در تنظیمات پاسخ‌های ایمنی و التهابات به‌خوبی شناخته شده، همچنین در بیماری‌های مختلفی مانند روماتوئید آرتریت، لوپوس و مالتیپل‌اسکلروزیس، مکان آن روی کروموزوم ۵ با موقعیت 5q34 گزارش شده است.

با توجه به اینکه پلی‌مورفیسم miRNAها و نقش آن‌ها در بسیاری از بیماری‌ها و بیماری MS اثبات شده است، همچنین نظر به اهمیت آن‌ها در درمان بیماری‌ها، بررسی نقش پلی‌مورفیسم miRNAها در بیماران ایرانی ضروری است؛ بنابراین در این مطالعه به بررسی نقش پلی‌مورفیسم miR-146a rs2910164 در ایجاد بیماری MS در بیماران استان همدان پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه مورد - شاهدی، ۱۵۰ بیمار مبتلا به مالتیپل‌اسکلروزیس و ۱۵۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند.

نمونه‌گیری خون از ۱۵۰ فرد مبتلا به بیماری مالتیپل‌اسکلروزیس (MS)، مراجعه‌کننده به مرکز MS همدان و بیمارستان فرشچیان به عمل آمد. نمونه‌ها براساس امکانات و دسترسی محدود به آن‌ها، و حجم نمونه برمبنای مفهوم واژه پلی‌مورفیسم (به‌معنی وجود حداقل دو آلل شایع یا تعداد بیشتر در جمعیت با فراوانی بیش از ۱٪) تعیین شدند. ۶۳٪ نمونه‌ها زن و مابقی مرد بودند و میانگین افراد شرکت‌کننده، ۶۱ سال بود. همه بیماران در فاز RR-MS (Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis) به سر می‌بردند (این فاز حالتی از بیماری است که عود مجدد حملات بیماری را در برمی‌گیرد)(جدول شماره ۱)

جدول شماره ۱: مشخصات ویژگی‌های بالینی افراد مورد مطالعه

شاخص		افراد بیمار	افراد سالم
سن (سال)		۱۷-۶۹	۲۰-۵۹
جنسیت	زن	٪۶۳	٪۵۸
	مرد	٪۳۷	٪۴۲

ابتدا ۴ میلی‌لیتراز خون محیطی افراد در لوله‌های حاوی EDTA ریخته شد، سپس DNA با روش نمک اشباع (Salting out) استخراج و تا زمان بررسی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

در این مطالعه، جهت بررسی چندشکلی

miR146a>(2910164 rs) و طراحی پرایمرهای مورد نیاز، با

مراجعه به بانک اطلاعاتی dpSNP موجود در پایگاه اینترنتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP و به کمک نرم‌افزار Primer1، یک جفت پرایمر بیرونی (Outer) و یک جفت پرایمر درونی (Inner) طراحی گردید، همچنین این پرایمرها توسط سرویس بلاست موجود در سایت NCBI برای یافتن نواحی دارای همولوژی در ژنوم انسان و جهت ساخت به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. توالی پرایمرها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

طول محصولات PCR در افراد دارای ژنوتیپ CC، ۲۴۰ و ۳۵۵ جفت باز، در افراد با ژنوتیپ GG، ۱۷۰ و ۳۵۵ جفت باز و در افراد هتروزیگوت CG، ۱۷۰، ۳۵۵ و ۲۴۰ جفت باز می‌باشد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱۰ میکرولیتر Master mix PCR(Amplicon Denmark) ۲X، تهیه‌شده از شرکت ویراژن، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای داخلی، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای خارجی صورت گرفت. تکثیر در ۳۲ سیکل، تحت دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۶۱/۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه و دمای طویل‌سازی ۷۲ درجه سانتیگراد با زمان ۵ دقیقه انجام شد. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ (حاوی ۰/۷ میکرولیتر رنگ Redsafe) و در کنار Ladder 50bp (SMO Bio Taiwan) بارگذاری شدند و باندها با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه، تعدادی از نمونه‌ها جهت مشخص شدن ژنوتیپ، تعیین توالی شدند.

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی چندشکلی mir 146a و پرایمرهای داخلی

پرایمر	فوروارد خارجی
توالی	5´TACTCCAGATGTTTATAACTCATGAGTGCC..3´
پرایمر	ریورس خارجی
توالی	5´ATATATTCAGAGCCTGAGACTCTGCCTT3´
پرایمر	فوروارد داخلی
توالی	5´TATAGGTTGTGTCAGTGTCAGACGTG.3´
پرایمر	ریورس داخلی
توالی	5´ATTATACTCTGCCTTCTGTCTCCAGTCT.3´

از آزمون مربع کای و نرم‌افزار آنلاین SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats) جهت تعیین وجود تعادل یا عدم آن با قانون تعال هاردی - واینبرگ در دو گروه مورد مطالعه، همچنین وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم مورد بررسی و وقوع بیماری MS استفاده شد.

یافته‌ها

در این تحقیق، ارتباط میان واریانت miR146a rs 2910164 با بروز بیماری MS در ۱۵۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفت. در هیچ‌کدام از حالت‌های غالب و مغلوب، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: فراوانی اللی و ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه

SNP.146 allele frequencies					
All subjects		Stat=Ca		Stat=Co	
Count	Proportion	Count	Proportion	Count	Allele
۲۲۸	۰/۷۳	۲۱۸	۰/۷۴	۴۴۶	C
۷۲	۰/۲۷	۸۲	۰/۲۶	۱۵۴	G

SNP.146 association with response Stat (n=300 crude analysis)					
Model	Genotype	Stat=Ca	Stat=Co	(CI 95%)OR	p
Codominant	C/C	۷۵ (٪۵۰)	۸۶ (٪۵۷/۳)	۱	۰/۳۷
	C/G	۶۸ (٪۴۵/۳)	۵۶ (٪۳۷/۳)	۰/۷۲ (۰/۴۵-۱/۱۵)	
	G/G	۷ (٪۴/۷)	۸ (٪۵/۳)	۱/۰۰ (۰/۳۵-۲/۸۸)	
Dominant	C/C	۷۵ (٪۵۰)	۸۶ (٪۵۷/۳)	۱	۰/۲
	C/G-G/G	۷۵ (٪۵۰)	۶۴ (٪۴۲/۷)	۰/۷۴ (۰/۴۷-۱/۱۷)	
Recessive	C/C-C/G	۱۴۳ (٪۹۵/۳)	۱۴۲ (٪۹۴/۷)	۱	۰/۷۹
	G/G	۷ (٪۴/۷)	۸ (٪۵/۳)	۱/۱۵ (۰/۴۱-۳/۲۶)	
Overdominant	C/C-G/G	۸۲ (٪۵۴/۷)	۹۴ (٪۶۲/۷)	۱	۰/۱۶
	C/G	۶۸ (٪۴۵/۳)	۵۶ (٪۳۷/۳)	۰/۷۲ (۰/۴۵-۱/۱۴)	

بحث

بررسی miRNAها و شناسایی عملکردشان در بسیاری از بیماری‌ها شامل: انواع مختلف سرطان، عفونت، حتی بیماری‌های خودایمنی مانند MS مورد توجه قرار گرفته است. نقش تنظیمی آنها نه تنها به مشخص‌تر شدن عملکرد بسیاری از ژن‌ها کمک می‌کند؛ بلکه می‌تواند در تشخیص و درمان بیماری نیز به‌عنوان یک بیومارکر کاربرد داشته باشد. تاکنون چندین مطالعه با هدف تعیین بیان miRNAها در بیماران مبتلا به MS با تکنیک‌هایی مانند Man-RT PCR Taq و ریزآرایه (Micro array) انجام شده که نتایج این مطالعات، نشان‌دهنده تفاوت در الگوی بیانی افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم مانند کاهش بیان miR-17، miR-20 و بالعکس افزایش بیان miR-145 در بیماران MS در مقایسه با گروه کنترل بوده است (۱۹). Li و همکاران (سال ۲۰۱۴) در مطالعه خود با بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C rs2910144<miR-146a G با بیماری MS در ۳۸۱ زن بیمار چینی و ۳۷۸ فرد سالم، افزایش ژنوتیپ GC و CC را در زنان بیمار چینی در مقایسه با زنان سالم نشان دادند (۲۰). Ridolfi و همکاران (سال ۲۰۱۳) نیز با بررسی ارتباط چندشکلی میکروRNA 23a و بیماری MS با استفاده از Real time PCR در جمعیت ایتالیا (شامل ۳۹۹ بیمار و ۴۲۰ فرد به‌عنوان گروه کنترل)، نشان دادند بیان miR-23a در سرم بیماران MS نسبت به نمونه کنترل دچار تنظیم کاهشی بوده است، همچنین افزایش مهمی در آلل C پلی‌مورفیسم miR-23a C>T(rs 3745453) در مقایسه با افراد کنترل گزارش کردند (۲۱). در مطالعه حاضر مشخص گردید miR-146a rs2910164 با بروز بیماری MS در جمعیت ایرانی ارتباطی ندارد، درحالی‌که پلی‌مورفیسم miR-146a rs2910164 در جمعیت چین با بروز بیماری MS، ارتباط معنی‌داری نشان داد. اختلاف در یافته‌های تحقیقات مشابه با مطالعه حاضر، می‌تواند به‌علت قومیت مورد بررسی باشد؛ زیرا در مطالعات دیگر قومیت از عوامل اصلی تعیین‌کننده وجود یا عدم همراهی و تعداد نمونه مورد بررسی عامل دیگری است که می‌تواند توجیه‌کننده تفاوت بین این مطالعات باشد. در نتیجه، افزایش تعداد نمونه‌ها و یا بررسی همراهی در سایر قومیت‌های ایرانی، نتایج متفاوتی را درپی داشته است؛ بنابراین، توصیه می‌گردد این مطالعه در حجم بزرگتر و در اقوام مختلف ایرانی تکرار شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد پلی‌مورفیسم rs2910164، در ژن miR146a، ارتباط معنی‌داری با بیماری MS در جمعیت مورد بررسی ندارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل نتایج بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. بدین‌وسیله از همکاری ارزشمند ریاست محترم آزمایشگاه ژنتیک پزشکی نیکا تهران، جناب آقای دکتر حبیب نصیری و نیـز تمـامی افراد شرکت‌کننده در طرح تحقیقاتی پایان‌نامه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004;431(7006):350-5 .PubMed
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(7):766-70. PubMed
3. Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, de Castro F. FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. J Neurosci 2011;31(42):14899-909. PubMed
4. Coolen M, Bally-Cuif L. MicroRNAs in brain development and physiology. Curr Opin Neurobiol 2009;19(5):461-70. PubMed
5. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. Nat Rev Genet 2009;10(10):704-14. PubMed
6. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. Transl Res 2011;157(4):163-79. PubMed
7. Deng JH, Deng P, Lin SL, Ying SY. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. Methods Mol Biol 2006;342:295-312. PubMed
8. Doerksen SE, Motl RW, McAuley E. En-vironmental correlates of physical activity in multiple sclerosis: A cross-sectional study. Int J Behav Nutr Phys Act 2007;4:49. PubMed
9. Etemadifar M, Sajjadi S, Nasr Z, Firoozeei TS, Abtahi SH, Akbari M, et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Iran. Eur Neurol 2013;70(5-6):356-63. PubMed
10. Goodin DS. Magnetic resonance imaging as a surrogate outcome measure of disability in multiple sclerosis: Have we been overly harsh in our assessment. Ann Neurol 2006;59(4):597-605. PubMed
11. Guerau-de-Arellano M, Alder H, Ozer HG, Lovett-Racke A, Racke MK. et al. miRNA profiling for biomarker discovery in multiple sclerosis: From microarray to deep sequencing. J Neuroimmunol 2012;248(1-2):32-9. PubMed
12. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: Isolation and characterization of the microprocessor complex. Methods Mol Biol 2006;342:33-47. PubMed
13. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: Genes, inflammation, and neurodegeneration. Neuron 2006;52(1):61-76. PubMed
14. He X, Yu Y, Awatramani R, Lu QR. Unwrapping myelination by microRNAs. Neuroscientist 2012;18(1):45-55. PubMed
15. Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. Trends Mol Med 2011;17(12):714-24. PubMed
16. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, schoenberg DR, de la Chapelle A, et al: Common SNP in pre-miR-146a oid carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 2008

17. 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(Pt 12):3342-52. PubMed

18. 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 2011;311(1-2):58-63. PubMed

19. Kurtzke JF. A reassessment of the distri-bution of multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1975;51(2):137-57. PubMed

20. 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. Cell Physiol Biochem 2015;35(1):281-91. PubMed

21. 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(3):4375-84. PubMed