تعیین عامل ژنتیک به روش تعین توالی نسل بعدی (NGS) در دو خانواده مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی خانوادگی مراجعه کننده به کلینیک ژنتیک مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی

شناسنامه طرح

کد رهگیری طرح	400117
تاریخ تصویب پیش پروپوزال	
عنوان طرح	تعیین عامل ژنتیک به روش تعین توالی نسل بعدی (NGS) در دو خانواده مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی خانوادگی مراجعه کننده به کلینیک ژنتیک مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی
عنوان لاتین طرح	Determination of genetic factors in two families with familial venous thromboembolism referred to the Genetics Clinic of Shahid Rajaei Cardiovascular Training, Research and Treatment Center by next generation sequencing (NGS)
تلفن	02123922327
پست الکترونیکی	mahshid.malakootian@gmail.com
نوع مطالعه	مطالعات علوم پایه
تاریخ شروع	1400/12/01
تاریخ خاتمه	1401/12/01
آیا طرح چند مرکزی است؟	خیر
مرکز/مراکز دیگر	
نام سازمان تصویب کننده اولیه پروپوزال	
محل اجرای طرح	
محل اجرای طرح	بیمارستان قلب شهید رجایی
سازمان مجری	بیمارستان قلب شهید رجایی
سازمان مجری	
دانشکده/محل خدمت	Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences
رشته تخصصی	سایر
توضیحات	
نوع طرح ها	

مجری همکاران

نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	نوع همکاری	توضیحات
مهشید ملکوتیان	مجری ونویسنده مقاله	بررسی ژنتیک	
پرهام صادقی پور	مجری اصلی / نویسنده مقاله	ارزیابی بالینی بیماران	
مجید ملکی	مجری ونویسنده مقاله	نظارت بر اجرای طرح	
مهدیه سویزی	همکار طرح	نوشتن پروپوزال	
مریم حسینی مقدم	همکار طرح	بررسی ژنتیک	
نوشین اشرفی	همکار طرح	بررسی ژنتیک	

دانشده/مرکز مربوطه

رده	نوع ارتباط با مرکز
مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک	وارد کننده

اطلاعات تفصیلی

آیتم ها	متن
بیان مسئله	(درصورت نیاز میتوانید از صفحات اضافه استفاده نمایید.) **تعریف** ترومبوآمبولی وریدی (VTE) شامل ترومبوز وریدی عمقی (DVT) و آمبولی ریه (PE) میباشد، که ترکیبی از عوامل خطر محیطی و ژنتیکی در خطر ابتلا به آن دخیل هستند. این اختلال سومین بیماری شایع قلبی عروقی پس از انفارکتوس میوکارد و سکته مغزی به شمار می اید. VTE با بروز سالانه 1 تا 2 در هر 1000 نفر جمعیت و مرگ و میر بالا شناخته شده است. مرگ در عرض 30 روز در حدود 6 درصد از بیماران مبتلا به DVT، عمدتاً از طریق آمبولی ریه و در 13 درصد از بیماران مبتلا به آمبولی ریه رخ می دهد.در بین بیماران تحت درمان، حدود 20 تا 50 درصد پس از DVT دچار سندرم پس از ترومبوتیک (PTS) می شوند و 3 درصد پس از آمبولی ریوی دچار فشار خون مزمن ترومبوآمبولیک ریوی می شوند(6). **طبقه بندی** DVT انسداد ترومبوتیک وریدهای عمقی که شامل تشکیل لخته خون در وریدهای عمیق بیشتر در پاها یا لگن است.(7) و یکی از علل مهم مرگ و میر است(8) . در واقع، 50 تا 70 درصد از بیماران مبتلا به DVT شواهدی از PE خاموش دارند و DVT در 70 تا 90 درصد بیمارانی که با PE مراجعه می کنند وجود دارد(9)علائم می تواند شامل درد، تورم، قرمزی و بزرگ شدن وریدها در ناحیه آسیب دیده باشد، اما برخی از DVT ها هیچ علامتی

ندارند. آمبولی ریه (PE): شایع ترین نگرانی تهدید کننده زندگی در مورد DVT احتمال آمبولی شدن لخته (جدا شدن از وریدها)، حرکت به صورت آمبولی در سمت راست قلب و قرار گرفتن در شریان ریوی است که خون را به ریه ها می رساند و آمبولی ریه را ایجاد میکند.(6)

علائم و نشانه ها

علائم و نشانه های DVT ساق یا لگن شامل درد ساق پا، تورم، اریتم و گشاد شدن وریدهای سطحی. DVT بازو علائم مشابه در بازو است. برخی از DVT ها بدون علامت هستند. تشخیص های افتراقی برای DVT اندام شامل سلولیت، لنفوم، نارسایی مزمن وریدی، هماتوم و برای DVT پا و کیست Baker پاره شده است(6). سطح D-dimer در اکثر بیماران مبتلا به DVT (حساسیت، 94-96٪) و همچنین در بیماران مسن تر و در بیماران مبتلا به بدخیمی، sepsis، التهاب، نارسایی مزمن کلیه، جراحی ، تروما، سوختگی شدید و بارداری افزایش می یابد(42-52%). بنابراین، یک نتیجه منفی D-dimer به حذف DVT کمک می کند، به ویژه زمانی که احتمال بالینی پایین است، و یک نتیجه مثبت D-dimer نیاز به تصویربرداری برای تایید DVT دارد. آزمایش D-dimer همچنین ممکن است برای پیش بینی خطر VTE مکرر پس از توقف ضد انعقاد استفاده شود، اما به عنوان یک تست غربالگری برای عود بیماری تحت بالینی یا برای نظارت بر پاسخ به ضد انعقاد توصیه نمی شود.(10).

عوامل دخیل در ایجاد بیماری

در میان فاکتورهای خطر محیطی، برخی تحریک کننده (مثل سرطان، جراحی، تروما یا شکستگی، بی حرکتی، بارداری و دوران پس از زایمان و ...) و برخی غیر تحریک کننده (مانند سن، جنس، نژاد و قومیت، شاخص توده بدنی و چاقی، استفاده از داروهای ضد بارداری خوراکی یا هورمون درمانی، استفاده از کورتیکواستروئید، مصرف استاتین، رژیم غذایی، فعالیت بدنی، زمان بی تحرکی و آلودگی هوا) هستند. علاوه بر این VTE دارای زمینه ی ژنتیکی قوی می باشد که تقریبا 50 تا 60 درصد از بروز بیماری به عوامل ژنتیکی نسبت داده میشود(2, 8).

عوامل خطر غیر قابل تغییر برای VTE: سن و جنس

اگرچه سن، جنس، و نژاد/قومیت ویژگی های غیرقابل تغییر هستند، درک خطر VTE با این ویژگی ها برای بهبود تشخیص و درمان VTE حیاتی است. در حالی که VTE می تواند در هر سنی رخ دهد، VTE اتفاقی بیشتر در افراد مسن رخ می دهد. در بزرگسالان جوان تا تقریباً اواسط میانسالی، VTE با نرخ پایین 0.5 تا 1 رویداد در هر 1000 نفر در سال رخ می دهد.12-13 این میزان در میانسالی افزایش می یابد و در سن 80 سالگی، بروز VTE به طور قابل ملاحظه ای بیشتر است و با سرعت تقریباً 5 تا7 VTE در هر

1000 نفر در سال رخ می دهد. اگرچه نقش سن بالا به عنوان یک عامل خطر مستقل برای VTE به خوبی شناخته نشده است، پیشنهاد شده است که انعقاد خون ممکن است با افزایش سن افزایش یابد(11)

بروز VTE در طول عمر نیز بر اساس جنسیت متفاوت است، با نرخ بروز در میان مردان (130 در هر 100000 نفر در سال) نسبت به زنان (110 در هر 100000 نفر در سال). با این حال، بحث برانگیز است که آیا مردان ذاتاً در معرض خطر بیشتری نسبت به زنان برای VTE هستند یا خیر. در بزرگسالان جوان تر، بروز سالانه VTE در میان زنان کمی بیشتر از مردان است، که این تفاوت به هورمونها نسبت داده می شود که در زنان در سال های باروری تأثیر می گذارد (12).

ژنتیک بیماری

بر اساس مطالعات، عوامل ژنتیکی مسئول تقریباً 60 درصد موارد DVT هستند (13). فاکتور V لیدن (FV)که شایع ترین علت ترومبوفیلی ارثی است، به دلیل مقاومت به پروتئین C، بیماران را مستعد ابتلا به DVT می کند. پروترومبین 20210یکی دیگر از علل شایع ترومبوفیلی ارثی، نیز یک خطر فاکتور برای DVT است(14). آنهایی که هموزیگوت برای گونه رایج ژن فیبرینوژن گاما rs2066865 هستند، حدود 1.6 برابر بیشتر در معرض خطر ابتلا به VTE هستند(15). تغییر ژنتیکی پروترومبین G20210A که سطح پروترومبین را افزایش می دهد، خطر را حدود 2.5 برابر افزایش می دهد(16). علاوه بر این، تقریباً 5 درصد از افراد با یک زمینه خطر ژنتیکی قابل مقایسه با جهش های فاکتور V لیدن و پروترومبین G20210A شناسایی شده اند(16).

دو پلی مورفیسم رایج در ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) شامل C677T و A1298C منجر به کاهش فعالیت آنزیم و در نتیجه افزایش سطح هموسیستئین می شود. چندین مطالعه نشان داده اند که این دو پلی مورفیسم ممکن است به دلیل هیپرهموسیستئینمی با DVT مرتبط باشند (17, 18) . پلی مورفیسم دیگری که به عنوان یک عامل خطر برای DVT شناخته می شود، (4G/5G (PAI-1 است. آلل 4G با سطح بالاتری از PAI-1 در پلاسما مرتبط است که به نوبه خود منجر به کاهش فعالیت فیبرینولیز و در نتیجه تمایل بیشتر به تشکیل ترومبوز می شود (19).

همچنین جهش های نادر در ژنهای PROC، PROS1 و SERPINC1 است که منجر به کمبود پروتئین های ضد انعقاد طبیعی (به ترتیب پروتئین C، پروتئین S و آنتی ترومبین) می شود. اخیراً، مطالعات ارتباط گسترده ژنوم (GWAS) ارتباط SNP های رایج را در 6 مکان ژنومی مختلف (ABO، F5، GP6، SERPINC1، CYP4V2 و HIVEP1) شناسایی کردند. با وجود این مشاهدات اخیر، واریانتهای ژنتیکی ایجاد شده موثر در خطر ابتلا به DVT تنها بخشی از وراثت پذیری بیماری را توضیح می دهد (2, 5).

داشتن گروه خونی غیر O تقریباً خطر VTE را دو برابر می کند(20). گروه خونی غیر O

	در سطح جهان رایج است و آن را به یک عامل خطر مهم تبدیل می کند(21). افراد بدون گروه خونی O دارای سطوح خونی فاکتور وان ویلبراند و فاکتور VIII بالاتری نسبت به افراد دارای گروه خونی O هستند که احتمال لخته شدن را افزایش می دهد(21). لازم به ذکر است که تا کنون هیچ گونه مطالعه مبنی بر توالی یابی ژنتیکی گسترده در ایران در خانواده ی مبتلا به VTE انجام نگرفته است، هرچند مطالعات اخیر نشان داده تعداد مبتلایان به VTE در سال 2015 به طور میانگین سالانه در بین بیماران بالغ مستعد شرایط ترومبوز ورید عمقی DVT در ایران 5288272 نفر بوده است. همچنین میانگین شیوع سالانه DVT در ایران بین 686928 تا 2089738 مورد تخمین زده شده است (22). لذا بررسی ژنتیکی موردی در افراد با سابقه خانوادگی در روند دست یافتن به جهش های جدید کمک قابل توجهی در روند تشخیص و درمان خواهد داشت که این مسئله در روند غربالگری نسل آینده مفید خواهد بود. با توجه به شیوع این بیماری و اهمیت دلایل ایجاد کننده بیماری و با توجه به اهمیت وراثت و عوامل ژنتیک در راستای تشخیص کمک به پیشگیری و درمان موثر موارد خانوادگی در این پژوهش با استفاده از بررسی جهش های شایع و همچنین NGS، به جهش های ژنتیکی جدید پی خواهیم برد تا راه کار مناسب برای پیشگیری و درمان پیش از وقوع موارد حاد توسط پزشک معالج به بیمار ارائه شود. در این تحقیق از دو خانواده که حداقل دو فرد مبتلا به DVT توسط پزشک محترم تشخیص داده شده است در ابتدا برای جهش های شایع و گزارش شده مرتبط با بیماری به روش سنگر و سپس برای بررسی گسترده تر از توالی یابی گستره اگزوم بهره خواهیم گرفت.
ضرورت اجرا	ترومبوآمبولی وریدی (VTE) در کنار بیماری عروق کرونر قلبی (CHD) و سکته سومین اختلال قلبی و عروقی بسیار رایج است(1) .ترومبوآمبولی وریدی (VTE) شامل ترومبوز وریدی عمقی (DVT) و آمبولی ریه (PE) است که ترکیبی از عوامل خطر محیطی و ژنتیکی در خطر ابتلا به آن دخیل هستند(2). ترومبوز ورید عمقی (DVT) ، یک بیماری ترومبوتیک رایج است که اغلب با آمبولی حاد ریوی ترکیب می شود و دارای جزء ژنتیکی قوی است که توسط مطالعه موارد خانوادگی و دوقلوها فراهم شده است (3).ژنتیک نقش قابل توجهی در ترومبوآمبولی وریدی (VTE) دارد با این وجود آزمایشات بالینی مبتنی بر تست های تشخیصی در تعداد کمی از مبتلایان قادر به شناسایی ترومبوفیلی ارثی شناخته شده میباشد.(4) عوامل خطر ژنتیکی شامل جهش های نادر در ژنهای PROC، PROS1 و SERPINC1 است که منجر به کمبود پروتئین های ضد انعقاد طبیعی (به ترتیب پروتئین C، پروتئین S و آنتی ترومبین) و پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی F5 rs6025 یا فاکتور V لیدن و (F2 rs1799963) یا پروترومبین G20210Aمیباشند. اخیراً، مطالعات گسترده ژنوم (GWAS) ارتباط SNP های رایج را در 6 مکان ژنومی مختلف در ژنهای (CYP4V2، ABO، F5، GP6، SERPINC1 و HIVEP1) شناسایی کردند (5).

	توالی یابی نسل بعدی DNA (NGS) بزرگ راه های جدیدی برای مطالعات مرتبط با ژنتیک در بیماریهای پیچیده ژنتیکی رایج مانند DVT باز کرده است و امکان توالی یابی بخش های بزرگی از ژنوم انسان (یا حتی کل ژنوم) را با سرعت بی سابقه فراهم می کند. با این حال، استفاده از این تکنیک ها برای بیماری های رایج هنوز به دلیل هزینه های بالا و بار محاسباتی قابل توجه مرتبط با تجزیه و تحلیل نمونه های متعدد محدود است. (5) با توجه به شیوع این بیماری و اهمیت دلایل ایجاد کننده بیماری و همچنین با توجه به اینکه تا کنون موارد خانوادگی در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است و تا سال 2015 تنها یک مطالعه مبنی بر تعداد مبتلایان به VTE گزارش شده است که در آن به طور میانگین سالانه در بین بیماران بالغ مستعد شرایط ترومبوز ورید عمقی DVT تعداد 5288272 نفر درگیر بوده اند و به علاوه اهمیت وراثت و عوامل ژنتیک در راستای تشخیص کمک به پیشگیری و درمان موثر موارد خانوادگی بر آنیم در این پژوهش با استفاده از تکنیک NGS، به ویژه در مواردی که بررسی جهش های شناخته شده و شایع با استفاده از روش تعیین توالی سنگر کمکی به تشخیص عوامل ژنتیکی نمیکند به جهش های ژنتیکی جدید پی برده و راه کار مناسب برای پیشگیری و درمان پیش از وقوع موارد حاد توسط پزشک معالج ارائه گردد لذا در این تحقیق از دو خانواده که حداقل دو فرد مبتلا به DVT در آنها شناسایی شده است ابتدا برای جهش های شایع به روش سنگر و سپس برای بررسی گسترده تر از توالی یابی گستره اگزوم بهره گرفته خواهد شد.
بررسی متون	از اوایل دهه 1990، اکتشافات و بینش های اولیه زیست شناسی، محققان را به هدف قرار دادن ژن های کاندید و پروتئین های آنها که مشکوک به تنظیم خطر VTE بودند، هدایت کرد. این تحقیقات اغلب در پروتئین های کلیدی مسیرهای انعقاد/ضد انعقاد و فیبرینولیز/آنتی فیبرینولیز انجام شده است. درک اینکه ژنتیک ممکن است بر خطر VTE تأثیر بگذارد با شناسایی مقاومت پروتئین C فعال در سال 1993 آغاز شد(23) و سپس توسط 2 گروه جداگانه در سال 1994 شناسایی جایگزینی غیرمترادف اسید آمینه فاکتور5 ناشی از پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن F5 انجام شد. این تغییر، F5 (rs6025) که در 2 تا 5 درصد افراد اروپایی شایع است، به عنوان FV Leiden شناخته می شود و خطر VTE را 2 تا 5 برابر در حامل های آلل خطر افزایش می دهد(24, 25). سایر اکتشافات ژن کاندید شامل جهش پروترومبین، F2 20210A (rs1799963) است که در کمتر از 2 درصد افراد اروپایی شایع است و با افزایش بیش از 2 تا 3 برابری خطر VTE مرتبط است 24–25 شیوع واریانتهای F5 و F2 در افراد غیر EA به طور قابل توجهی کمتر است ـ یا وجود ندارد. سایر مطالعات ژن کاندید منجر به کشف تغییرات ژنتیکی در گیرنده پروتئین C (PROCR) و در یکی از سه ژن فیبرینوژن (FGG)، شده است(26, 27). در ابتدای پایان دهه اول قرن بیست و یکم، مجموعه ای از GWAS با اندازه نمونه های

پیوسته و بزرگ (جمعیت های بزرگ) و تعداد بیشتری از واریانتهای بررسی شده منتشر شد. در سال 2008، اولین بررسی گسترده ژنومی از واریانتهای ژنتیکی برای VTE در 3 مطالعه موردی و شاهدی از اولین DVT انجام شد(28). محققین هلندی سه پلی مورفیسم را در CYP4V2 شناسایی کردند که به شدت با DVT مرتبط بود که بعدها مشخص شد که در عدم تعادل پیوندی با F11، آنتی ترومبین (SERPINC1) و GP6در ارتباط است(29). در سال 2009، محققان فرانسوی 317139 تغییر را در 453 مورد و 1327 کنترل مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند(30). این اولین بررسی آگنوستیک ژنوم انسان برای ارتباط با VTE بود. این تیم 3 تغییر در 2 ژن (F5 و ABO) را شناسایی کردند که با VTE مرتبط هستند.

اخیراً تنها یک تحقیق کامل اگزوم منتشر شده است(31). در مطالعه مورد-شاهدی 393 مورد VTE ایدیوپاتیک، یک VTE جدید مرتبط برای STAB 2 پیدا شد که قبلاً در ارتباط با سطوح پلاسمایی فاکتور ویلبراند و فاکتور VIII توضیح داده شده بود(32, 33). توالی یابی کل ژنوم برای بیش از 3700 مورد VTE در برنامه ملی قلب، ریه و خون در برنامه Precision Medicine (TOPMed) تکمیل شده است و انتظار می رود که شرکت کنندگان با توالی یابی شده وسیع در سال 2021 در مطبوعات منتشر شود(34).

در مطاله توالی یابی کل اگزوم برای خانواده مبتلا به DVT در یک خانواده چینی در سال 2019 یک تغییر جدید از نوع missense هتروزیگوت ، c.281T>C، در ژن SERPINC1 شناسایی شد(35).

در مطالعه انجام شده در ایران برای تخمین تعداد مبتلایان به VTE در سال 2015 به این نتیجه رسیده شده که میانگین سالانه تعداد کل بیماران بالغ مستعد شرایط ترومبوز ورید عمقی DVT در ایران 5288272 نفر بوده است. میانگین شیوع سالانه DVT در ایران بین 686928 تا 2089738 مورد و میانگین شیوع سالانه DVT در بین بیماران بزرگسال ایرانی بستری با خطر DVT تقریباً بین 90/129 تا 16/395 مورد در هر 1000 بیمار تخمین زده شده است (22).

مطالعه موردی-شاهدی در ایران در سال 2021 بر روی فاکتور V لیدن یک عامل خطر مستقل و وابسته به جنسیت برای ترومبوآمبولی وریدی نشان داد مقاومت پروتئین C فعال APCR به دلیل جهش فاکتور V لیدن (R506Q) (FVL) یک عامل خطر اصلی در بیماران مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی است. این مطالعه نشان داد که احتمال APCR در مردان 2.3 برابر بیشتر از زنان است خطر ترومبوز ورید عمقی DVT و آمبولی ریه PE در بیماران APCR به ترتیب 4.5 و 3.2 برابر بیشتر از گروه کنترل بود (36).

منابع

1. Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B, Lind-Hallden C, Hallden C, Elf J. Genetic risk factors for venous thromboembolism. Expert review of hematology. 2020;13(9):971-81.

Crous-Bou M, Harrington LB, Kabrhel C. Environmental and Genetic Risk Factors .2
Associated with Venous Thromboembolism. Seminars in thrombosis and hemostasis.
.2016;42(8):808-20

Lotta LA, Wang M, Yu J, Martinelli I, Yu F, Passamonti SM, et al. Identification of .3
genetic risk variants for deep vein thrombosis by multiplexed next-generation
sequencing of 186 hemostatic/pro-inflammatory genes. BMC medical genomics.
.2012;5(1):1-12

Lee EJ, Dykas DJ, Leavitt AD, Camire RM, Ebberink E, Garcia de Frutos P, et al. .4
Whole-exome sequencing in evaluation of patients with venous thromboembolism.
.Blood advances. 2017;1(16):1224-37

Lotta LA, Wang M, Yu J, Martinelli I, Yu F, Passamonti SM, et al. Identification of .5
genetic risk variants for deep vein thrombosis by multiplexed next-generation
sequencing of 186 hemostatic/pro-inflammatory genes. BMC medical genomics.
.2012;5:7

Kruger PC, Eikelboom JW, Douketis JD, Hankey GJ. Deep vein thrombosis: update .6
.on diagnosis and management. The Medical journal of Australia. 2019;210(11):516-24

Heil J, Miesbach W, Vogl T, Bechstein WO, Reinisch A. Deep Vein Thrombosis of the .7
.Upper Extremity. Deutsches Arzteblatt international. 2017;114(14):244-9

Hosseini S, Kalantar E, Hosseini MS, Tabibian S, Shamsizadeh M, Dorgalaleh A. .8
Genetic risk factors in patients with deep venous thrombosis, a retrospective case
.control study on Iranian population. Thrombosis journal. 2015;13:35

Laffan M. Genetics and pulmonary medicine. 4. Pulmonary embolism. Thorax. .9
.1998;53(8):698-702

Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future .10
.prospects. Blood. 2009;113(13):2878-87

Luxembourg B, Schmitt J, Humpich M, Glowatzki M, Seifried E, Lindhoff-Last E. .11
Intrinsic clotting factors in dependency of age, sex, body mass index, and oral
contraceptives: definition and risk of elevated clotting factor levels. Blood coagulation &
.fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis. 2009;20(7):524-34

Bell EJ, Lutsey PL, Basu S, Cushman M, Heckbert SR, Lloyd-Jones DM, et al. .12
Lifetime Risk of Venous Thromboembolism in Two Cohort Studies. The American
.journal of medicine. 2016;129(3):339 e19-26

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, et al. Genetic .13
susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT
.study. The American Journal of Human Genetics. 2000;67(6):1452-9

Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. The New .14

.England journal of medicine. 2001;344(16):1222-31

Paulsen B, Skille H, Smith EN, Hveem K, Gabrielsen ME, Brækkan SK, et al. .15 Fibrinogen gamma gene rs2066865 and risk of cancer-related venous .thromboembolism. haematologica. 2020;105(7):1963

Klarin D, Busenkell E, Judy R, Lynch J, Levin M, Haessler J, et al. Genome-wide .16 association analysis of venous thromboembolism identifies new risk loci and genetic .overlap with arterial vascular disease. Nature genetics. 2019;51(11):1574-9

Pop TR, Vesa SC, Trifa AP, CRIŞAN S BA. PAI-1 4G/5G and MTHFR C677T .17 polymorphisms increased the accuracy of two prediction scores for the risk of acute .lower extremity deep vein thrombosis. Rom J Morphol Embryol. 2014;55(1):153

Oztuzcu S, Ergun S, Ulaşlı M, Nacarkahya G, Iğci YZ, Iğci M, et al. Evaluation of .18 Factor V G1691A, prothrombin G20210A, Factor XIII V34L, MTHFR A1298C, MTHFR C677T and PAI-1 4G/5G genotype frequencies of patients subjected to cardiovascular disease (CVD) panel in south-east region of Turkey. Molecular biology reports. .2014;41(6):3671-6

Akhter MS, Biswas A, Ranjan R, Meena A, Yadav BK, Sharma A, et al. .19 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is seen in higher frequency in the Indian patients with deep vein thrombosis. Clinical and .Applied Thrombosis/Hemostasis. 2010;16(2):184-8

Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous .20 .thromboembolism. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2012;32(3):563-8

Dentali F, Sironi AP, Ageno W, Turato S, Bonfanti C, Frattini F, et al., editors. .21 Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: results from a meta-analysis of the literature. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2012: Thieme .Medical Publishers

Sharif-Kashani B, Mohebi-Nejad A, Abooturabi S-M. Estimated prevalence of .22 venous thromboembolism in Iran: Prophylaxis still an unmet challenge. Tanaffos. .2015;14(1):27

Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously .23 unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. Proceedings of the National .Academy of Sciences. 1993;90(3):1004-8

Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S .24 .deficiency in familial thrombotic disease. Blood. 1984;64(6):1297-300

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. .25 Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. .Nature. 1994;369(6475):64-7

Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, .26 Bertina RM. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels. Blood. .2005;106(13):4176-83

Lindstrom S, Wang L, Smith EN, Gordon W, van Hylckama Vlieg A, de Andrade M, .27 et al. Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci .for venous thromboembolism. Blood. 2019;134(19):1645-57

Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. Gene .28 .variants associated with deep vein thrombosis. Jama. 2008;299(11):1306-14

Li Y, Bezemer I, Rowland C, Tong C, Arellano A, Catanese J, et al. Genetic variants .29 associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. Journal of thrombosis and .haemostasis. 2009;7(11):1802-8

Trégouët D-A, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved J-F, Pernod G, et al. .30 Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. Blood, The Journal of the American .Society of Hematology. 2009;113(21):5298-303

Desch KC, Ozel AB, Halvorsen M, Jacobi PM, Golden K, Underwood M, et al. .31 Whole-exome sequencing identifies rare variants in STAB2 associated with venous .thromboembolic disease. Blood. 2020;136(5):533-41

Smith NL, Rice KM, Bovill EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B, et al. Genetic .32 variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. Blood, The Journal of the American Society of Hematology. .2011;117(22):6007-11

Smith NL, Chen M-H, Dehghan A, Strachan DP, Basu S, Soranzo N, et al. Novel .33 associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome .Epidemiology) Consortium. Circulation. 2010;121(12):1382-92

Baylis RA, Smith NL, Klarin D, Fukaya E. Epidemiology and genetics of venous .34 thromboembolism and chronic venous disease. Circulation Research. .2021;128(12):1988-2002

Peng Y, Wang T, Zheng Y, Lian A, Zhang D, Xiong Z, et al. A novel variation of .35 SERPINC1 caused deep venous thrombosis in a Chinese family: A case report. .(Medicine. 2019;98(1

Takhviji V, Zibara K, Maleki A, Azizi E, Hommayoun S, Tabatabaei M, et al. A .36 case-control study on factor V Leiden: an independent, gender-dependent risk factor .for venous thromboembolism. Thrombosis Journal. 2021;19(1):1-9

اهداف: هدف اصلی، اهداف اختصاصی، هدف کاربردی	**اهداف (خروجی ها) اصلی طرح8 :** تعیین عامل ژنتیک به روش تعین توالی نسل بعدی (NGS) در دو خانواده مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی خانوادگی مراجعه کننده به کلینیک ژنتیک مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی **اهداف (خروجی ها) اختصاصی طرح9 :** تععین الگوی وراثتی در خانواده بیمار و بررسی عوامل ژنتیکی در سایر افراد سالم و مبتلا در خانواده ی فرد مبتلا **اهدف کاربردی طرح10 :** آگاهی به خانواده ی فرد مبتلا و افراد ناقل در خانواده برای ارائه مشاوره و پیشگیری پیش از وقوع موارد حاد امکان استفاده از جهش های پیدا شده به عنوان یک عامل کمک کننده جهت غربالگری پیش از تولد به ویژه در موارد خانوادگی
فرضیات یا سوالات پژوهشی	آیا رابطه معنی داری بین جهش های پیدا شده در بیمار انتخاب شده و نوع بیماری در این مطالعه دیده می شود یا خیر؟ تغییر ژنتیکی خاصی در تغییرات پیدا شده با بیماری ارتباط دارد. تغییر ژنتیکی در تغییرات پیدا شده با بیماری ارتباط ندارد. تغییر ژنتیکی پیدا شده می تواند به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری در غربالگری پیش از تولد در نظر گرفته شودیا خیر؟
روش اجرا	(باتوجه به بند قبل موارد لازم برای هر نوع مطالعه را در این قسمت شرح دهید و درصورت نیاز میتوانید از صفحات اضافه استفاده نمایید) حداقل یک فرد مبتلا به VTE در یک خانواده با سابقه ی خانوادگی از بیماری انتخاب می شود. معیارهای ورود و خروج مناسب برای فرد در نظر گرفته خواهد شد. متغیرهای گوناگون شامل سابقه خانوادگی بیماری مادرزادی قلبی، سابقه بیماری در مادر در حین بارداری، سابقه بیماری های ژنتیکی دیگر در خانواده فرد، مشخصات فنوتیپی، وجود سابقه فوت ناگهانی در خانواده فرد، داروهای مصرفی و غیره بوسیله پرسشنامه از قبل طراحی شده ثبت خواهد شد. از فرد، فرم رضایت نامه تصویب شده براساس کمیته

	اخلاق وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی اخذ می گردد. در ادامه،5 سی سی خون تازه از افراد انتخاب شده ،در لوله هایEDTA دار جمع آوری شده و در مرحله بعد جهت بررسی های مولکولی، استخراج DNA با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع (salting out)، انجام می شود . تکثیر قطعات ژنی مورد نظر در گروه های مورد مطالعه، با استفاده از پرایمرهایی که با نرم افزارهای Oligoanalyser ،Primer3 و UCSC Blat طراحی می شوند، صورت خواهد گرفت. در این تحقیق با استفاده از روش توالی یابی سنگر، پلی موفیسم های معین شده در مورد ژن های MTHFR ، F5 ،F2 و SERPINC1 برای فرد و افراد خانواده مورد بررسی قرار خواهند گرفت. بدین منظور توالی مورد نظر به کمک واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) تکثیر خواهد شد. پس از آن، مراحل تکثیر و شستشو به منظور آماده سازی قطعات DNA جهت انجام فرایند توالی یابی(Sequencing) به انجام خواهد رسید. در نهایت، اطلاعات استخراج شده با روشهای فوق الذکر (ژنوتیپ افراد)، با اطلاعات دموگرافیک و بالینی (فنوتیپ)، تطبیق داده شده و نتایج نهایی استخراج می گردد. نهایتا، توالی های مشخص شده، به منظور بررسی SNPها توسط کارشناسان بررسی و تفسیر خواهدشد. در صورت عدم وجود تغییرات مورد بررسی به عنوان فاکتور بیماری زا نمونه ی DNA فرد مبتلا جهت آزمایشات تکمیلی شامل انجام توالی یابی کل ژنوم جهت دست یافتن به تغییرات جدید و یا ژنهای مرتبط با بیماری که پیش از این در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار نگرفته است ارسال خواهد شد و مجددا تمامی نتایج توسط کارشناسان آنالیز خواهد شد. از مجموع نتایج Sequencing و NGS برای مشخص کردن علل ژنتیکی بیماری ترومبوز وریدی و شیوع آن در جمعیت ایران بهره خواهیم جست. سپس تغییر ژنتیکی پیدا شده در افراد علامت دار و بدون علامت خانواده ی فرد مبتلا مورد بررسی قرار خواهد گرفت.
مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن	جامعه آماری شامل فرد یا افراد مبتلا به VTE خانوادگی است که در این مطالعه برای دو فرد از دو خانواده ایرانی مراجعه کننده به بیمارستان قلب شهید رجایی پس از تشخیص بیماری توسط پزشک محترم به وسیله ی علایم بالینی و سمعی و آزمایشات بالینی، فرم های رضایت نامه تصویب شده براساس کمیته اخلاق وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی اخذ می گردد. معیار ورود به مطالعه داشتن علامت بالینی مربوط به بیماری VTE است که عبارتند از: تورم در یک یا هر دو پا درد ساق پا، مچ پا، پا یا بازو.

	تورم و گشاد شدن وریدهای سطحی پوست قرمز یا تغییر رنگ سطح D-dimer بالا سپس بیمار برای انجام نمونه گیری به آزمایشگاه کاردیوژنتیک ارجاع داده خواهند شد و در آنجا جمع آوری سوابق بیمار از فرد کاندید و همچنین مشاوره جهت تکمیل اطلاعات و شجره ی خانوادگی صورت میپذیرد. متغیرهای گوناگون شامل سابقه خانوادگی بیماری مادرزادی قلبی، سابقه بیماری در مادر در حین بارداری، سابقه بیماری های ژنتیکی دیگر در خانواده فرد، مشخصات فنوتیپی، وجود سابقه فوت ناگهانی در خانواده فرد، داروهای مصرفی و غیره بوسیله پرسشنامه از قبل طراحی شده ثبت خواهد شد. همچنین عدم تمایل بیمار به ادامه مطالعه به عنوان معیار خروج در مطالعه حاضر در نظرگرفته می شوند. در ابتدا جهش های شایع برای فرد مبتلا بررسی و در صورت عدم مشاهده تغییر ژنتیکی نمونه فرد برای توالی یابی کامل اگزوم NGS اماده خواهد شد.
روش محاسبه حجم نمونه و تعدادآن	این مطالعه از نوع موردی است و تنها 2 فرد از دو خانواده که حداقل دو فرد مبتلا با علائم مشابه در خانواده دارند انجام خواهد گرفت و سپس تغییر ژنتیک پیدا شده در افراد علامت دار و بدون علامت بررسی خواهد شد لذا محاسبه حجم نمونه و آمار دخیل نمیباشد.
ملاحظات اخلاقی	دریافت رضایت نامه کتبی از خانواده ها به انجام خواهد رسید. پس از آگاهی کامل افراد فرم رضایت نامه جهت جمع آوری و حفظ اطلاعات و شرکت در طرح پژوهشی توسط وی امضاء می گردد. اطلاعات جمع آوری شده کاملا محفوظ و محرمانه می باشد. به افرادی که در مطالعه شرکت می کنند، در زمان مناسب و به روش مناسب، آگاهی لازم در مورد اهداف پژوهش داده می شود. در ضمن، در صورتیکه مطالعه، نتایج پیشگویی کننده ای در ارتباط با سلامت یا سایر جنبه های زندگی بستگان یا نزدیکان آزمودنی داشته باشد، نحوه ی اطلاع رسانی احتمالی به ایشان یا محرمانه ماندن نتایج در طی فرایند اخذ رضایت در رضایتنامه درج شود و در قسمت ملاحظات اخلاقی نیز اضافه شود. بازپرداخت مخارجی که آزمودنی در اثر شرکت در مطالعه متحمل میشود در هزینه ها مد نظر قرار می گیرد.
محدودیتهای اجرایی طرح	

وروش کاهش آنها	در حال حاضر با توجه به اینکه استفاده از روش توالی یابی نسل بعدی NGS برای بیماران خارج از کشور انجام می پذیرد لذا انجام خدمت همراه با هزینه های سنگین و همچنین زمان طولانی همراه می باشد همچنین برای رسیدن به نتایج کاربردی تر انجام آزمایش برای بیمار شرکت کننده در طرح با سابقه ی خانوادگی مرتبط لازم و ضروری است که این مسئله روند دسترسی به نمونه را کند خواهد کرد. انجام NGS برای موارد خانوادگی و دست یافتن به جهش های شایع و جدید این امکان را برای سایر افراد مبتلا فراهم میسازد تا با کاهش هزینه و در مدت زمان کوتاه تر به نتیجه مناسب دست پیدا کنند.

جدول متغیرها

نام متغیر	نقش متغیر	نوع متغیر کمی ـ پیوسته است؟	نوع متغیر کمی ـ گسسته است؟	نوع متغیر کیفی ـ رتبه ای است؟	نوع متغیر کیفی ـ اسمی است؟	واحد اندازه گیری	تعریف کاربردی	نحوه اندازه گیری
FV	مستقل	☐	☐	☐	☒	توالی یابی	وجود SNP مورد نظر در توالی ‍ژنی فرد	توالی یابی
F2	مستقل	☐	☐	☐	☒	توالی یابی	وجود SNP مورد نظر در توالی ‍ژنی فرد	توالی یابی
MTHFR	مستقل	☐	☐	☐	☒	توالی یابی	وجود SNP مورد نظر در توالی ‍ژنی فرد	توالی یابی
SERPIN C1	مستقل	☐	☐	☐	☒	توالی یابی	وجود SNP مورد نظر در توالی ‍ژنی فرد	توالی یابی
NGS	مستقل	☐	☐	☐	☒	توالی یابی	وجود تغییر در توالی اگزوم	توالی یابی

زمانبندی و اجرا

شرح مختصر مرحله	درصد مرحله	مدت زمان اجرا ـ ماه	از تاریخ	تا تاریخ
مرور مقالات و مطالب لازم		1		
تهیه پرایمر و مواد مصرفی خارجی		2		
شناسایی جمعیت مورد مطالعه و نمونه‌گیری		3		
استخراج DNA		1		
PCR ژن های مورد نظر		2		
Sequence ژن های مورد نظر و تفسیر نتایج		3		
ارسال برای توالی یابی گسترده ژنوم		6		
آنالیز نتایج و تفسیر		3		

زمانبندی و اجرا

شرح مختصر مرحله	درصد مرحله	مدت زمان اجرا ـ ماه	از تاریخ	تا تاریخ
جمع‌آوری اطلاعات		3		
تألیف مقاله و گزارش نهایی		2		

هزینه آزمایشات و خدمات تخصصی

نام خدمت	نام مؤسسه ارائه کننده خدمت	تعداد یا مقدار لازم	قیمت واحد ـ ریال	قیمت کل ـ ریال
استخراج DNA		2	300,000	600,000
PCR		2	200,000	400,000
تعیین توالیSequencing ژن 1) MTHFR اگزون)		2	600,000	1,200,000
تعیین توالیSequencing ژن 1)FV اگزون)		2	600,000	1,200,000
تعیین توالیSequencing ژن 1)F2 اگزون)		2	600,000	1,200,000
تعیین توالیSequencing ژن 8) SERPINC1 اگزون)		2	600,000	1,200,000
تعیین توالی کامل اگزوم NGS		2	165,000,000	330,000,000

جمع کل هزینه های طرح

هزینه پرسنلی (هیات علمی و غیر هیات علمی)	هزینه مواد مصرفی	هزینه مواد غیر مصرفی	هزینه تجهیزات،موادوخدمات موجوددر مرکز	هزینه مسافرت	هزینه چاپ و تکثیر	سایر هزینه ها	جمع کل هزینه ـ ریال
0	0	0	335,800,000	0	0	0	335,800,000