بیمارستان قلب شهید رجایی

بررسی مکانیسم اثر داروهای Endothelin receptor antagonist در درمان بیماران نقص دیواره بین دهلیزی (ASD) دارای فشار خون شریان ریوی (PAH) در سطح ژن/ non-coding RNA

شناسنامه طرح

کد رهگیری طرح	401075
تاریخ تصویب پیش پروپوزال	
عنوان طرح	بررسی مکانیسم اثر داروهای Endothelin receptor antagonist در درمان بیماران نقص دیواره بین دهلیزی (ASD) دارای فشار خون شریان ریوی (PAH) در سطح ژن/ non-coding RNA
عنوان لاتین طرح	Evaluation of the mechanism of action of Endothelin receptor antagonist drugs in the treatment of patients with atrial septal defect (ASD) with pulmonary artery hypertension (PAH) at the gene / non-coding RNA level
تلفن	09112910278
پست الکترونیکی	akram.gholipour199069@gmail.com
نوع مطالعه	مطالعات علوم پایه
تاریخ شروع	1401/09/01
تاریخ خاتمه	1403/09/01
آیا طرح چند مرکزی است؟	بله
مرکز/مراکز دیگر	
نام سازمان تصویب کننده اولیه پروپوزال	صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور
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 اصلی / نویسنده مقاله	بررسی ژنتیک	
اکرم قلی پور	همکار طرح و نویسنده مقاله	بررسی ژنتیک	
مائده عربیان	همکار طرح	بررسی آزمایشگاهی	
مجید ملکی	همکار طرح	ارزیابی بالینی بیماران	
زهرا خواجعلی	همکار طرح	ارزیابی بالینی بیماران	

دانشده/مرکز مربوطه

رده	نوع ارتباط با مرکز
مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک	وارد کننده

اطلاعات تفصیلی

آیتم ها	متن
بیان مسئله	نقایص مادرزادی قلبی (CHD) بیش از 40 درصد از مرگ و میرهای قبل از تولد و بیش از 20 درصد مرگ و میر را در چندماه اول پس از تولد تشکیل می دهند (1). نقایص مادرزادی قلبی شامل طیف وسیعی از بیماریها است که یکی از شایع ترین آنها بیماری نقص سپتوم دهلیزی (ASD) می باشد که یکی از بیماریهای مادزادی قلبی با شیوع 1.6 در هر 1000 تولد است که 8-10 درصد تمام بیماریهای مادرزادی قلبی را به خود اختصاص می دهد (2). فشار شریان ریوی (PAH) به عنوان فشار سیستولیک شریان ریوی (PASP≥40mmHg) در 6 الی 35 درصد از بیماران ASD دیده می شود (3،4) که می تواند منجر به heart failure و افزایش مرگ و میر شود (5). بیماران مبتلا به نقص سپتوم دهلیزی (ASD) دارای فشار خون شریان ریوی (PAH) متوسط الی شدید، یک معضل بالینی را ایجاد می کنند زیرا مرتبط شدن بیماری نقص سپتوم دهلیزی با PAH در اکثر مواقع غیر قابل بازگشت بوده و هم از لحاظ کیفیت زندگی و هم طول زندگی برای بیماران هزینه هایی را ایجاد می کند (6). بنابراین، بازسازی انسداد دیواره عروق ریه باید در مرحله اولیه ارزیابی شود تا نرخ درمان بیماران مبتلا افزایش یابد (7). امروزه اپی ژنتیک یکی از مواردی است که در پاتولوژی بیماریهای قلبی-عروقی مانند CHD نقش دارد. متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی دو واحد اپی ژنتیک مهم هستند که در کنار این دو، مولکولهای non-coding RNA هم جزء تغییرات اپی ژنتیکی بوده و در مرحله پس از رونویسی بیان ژن را تنظیم می¬کنند. بهترین گروه مطالعه شده در non-coding RNAها، miRNAها هستند که طولی تقریبا 22 نوکلئوتید داشته و از نظر تکامل حفاظت شده¬اند. در طی سالهای اخیر، با بررسی پروفایل بیانی miRNAها مشخص شده است که تغییرات اختصاصی در آنها می¬تواند منجر به ایجاد بیماریهایی مانند انواع CHD شود (8،9). بسیاری از داروها برای عملکرد، به بیان ژن های خاصی نیاز دارند و عملکرد دارو می تواند تحت تأثیر تغییرات در سطح بیان این ژن های فارماکوژنومیک قرار گیرد. MiRNA ها یکی از عوامل تنظیمی مهم در پاسخ دارویی می باشند که تحت عنوان Pharmaco-miRs نامیده می شود و با تنظیم منفی بیان ژن هایی که برای عملکرد دارو مهم هستند نقش مهمی در فارماکوژنومیک دارند، به عنوان مثال از طریق تنظیم ژن های کلیدی متابولیزه کننده دارو مانند خانواده سیتوکروم P450 (CYP) (10-11). به این ترتیب miRNA ها بسیاری از ژن های دخیل در فارماکوژنومیک را تنظیم کرده و در نتیجه مطالعات فارماکوژنومیک شامل miRNA ها بینشی جدید در مورد مکانیسم های مولکولی پاسخ دارویی و تغییرات بالقوه اپی ژنتیک ارائه می دهد و مطالعات اساسی در مورد نقش تنظیم ژنهای اهداف miRNAها نیز برای درک جامع نقش miRNA ها در پاسخ به دارو حیاتی خواهد بود. (12،13). همچنین، در دهه گذشته، تغییر چشمگیری در گزینه های درمانی بیماران دارای فشار خون شریانی ریوی (PAH) از

	جمله پروستاسیکلین ها، آنتاگونیست های گیرنده اندوتلین و مهارکننده های فسفودی استراز (نوع 5) صورت گرفته است. آنتاگونیست های گیرنده اندوتلین (ERAs) در حال حاضر بیشترین استفاده را در درمان PAH-CHD دارند که به طور قابل توجهی کلاس عملکردی را مستقل از محل نقص سپتوم و بدون به خطر انداختن اشباع اکسیژن، بهبود بخشیدند. این امر منجر به کاهش عوارض و افزایش بقای نه تنها بیماران مبتلا به PAH ایدیوپاتیک، بلکه همچنین بیماران مبتلا به PAH و بیماری مادرزادی قلبی زمینه ای (CHD) شده است (14-16). با گسترش علم ژنتیک مولکولی و یافتن اساس مکانیسم های اثر داروها ، بسیاری از محققان امیدوارند بتوانند با رهگیری و بررسی مکانیسم ها و شبکه های دخیل در مکانیسم اثر داروهای اختصاصی، مداخله گرهای ژنتیکی را شناسایی کنند. این مداخله- گرهای ژنتیکی را می توان ، به عنوان مارکرهایی برای پیش بینی پاسخ مطلوب به درمان پزشکی بررسی کرد.
ضرورت اجرا	ASD یکی از شایع ترین بیماریهای مادرزادی قلبی است و در طی پیشرفت این بیماری به سمت PAH و نارسایی قلبی ایجاد شده به وسیله ی آن، بار عمده ای در سلامت عمومی جامعه می باشد و غالباً فرآیند ایجاد آن از نظر بالینی خاموش است که این امر در اواخر روند پیشرفت بیماری منجر به بروز علائم می شود. درمانهای دارویی استفاده شده، سیر این بیماری را تغییر داده است. اخیراً، این داروها در جمعیت ASD-PAH استفاده شده است اما با این حال، پیش بینی پاسخ به این درمان مشخص نشده است. در نتیجه بررسی نشانگرهای حساس زیستی و تاثیرگذار بر مکانیسم اثر دارو، می تواند روش مؤثری جهت تشخیص یا پیش آگهی پاسخ به درمان باشد. بررسی وضعیت مکانیسم اثر دارو در سطح بیان ژن و non-coding RNAها ، دو نتیجه اصلی دربر خواهد داشت: مسیر مولکولی و شبکه های ژنی دخیل در اثرگذاری دارو شفاف تر شده وثانیاً می توان مارکرهای جدیدی را جهت بهبود عملکرد داروهای مورد استفاده کاندید نمود.
بررسی متون	نقایص مادرزادی قلبی شایع ترین ناهنجاری مادرزادی قلبی است که شامل ناهنجاریهای ساختاری و عملکردی متعددی در قلب و عروق است و شیوع آن تقریباً 8 مورد از هر 1000 نوزاد است (17). بیماری ASD به عنوان دومین نقایص مادرزادی قلبی شایع در جهان می باشد و براساس درگیری ساختاری قلبی به زیرگروههای مختلفی تقسیم می شود و ASDII بیشترین نوع این بیماری است که به دلیل عدم رشد کافی Septum secundum ایجاد شده و 4/3 (سه چهارم) تمام موارد ASD را به خود اختصاص می دهد (18،19). این بیماری با فشار شریان ریوی، ،right heart failure atrial fibrillation و سکته مرتبط است (20،21) . بیماران ASD که به سمت PAH توسعه می یابند، مجموعه ای از پیچیدگیها را براساس سایز و شرایط و درجه نقص موجود، دارند. این بیماران دارای نقص متوسط به سمت شدید می باشند که ترمیم نقص در آنها اغلب نامناسب بوده و مدیریت شرایط این گروه از بیماران بسیار محدود می باشد (22). به طور کلی بیماران ASD که همراه با PAH می باشند، با میزان مرگ بالایی همراه بوده و باید تحت نظارت دقیق قرار گیرند (23). تخمین میزان دقیق شیوع PAH به علت اتیولوژی پیچیده-ی آن بسیار مشکل است اما بعضی مطالعات نشان داده که میزان شیوع آن 6.6% است (24،25). مکانیسم پاتوفیزیولوژیکی آن منجر به افزایش فشار در رگهای ریوی شده که با vascular remodeling مرتبط است که باعث عدم عملکرد اولیه در سلولهای اندوتلیال یا smooth muscle cell شده که با آسیب اکسیداتیو، آنژیوژنز غیرنرمال و التهاب همراه است (26). روشهای ژنتیکی بر پایه تکنیکهای مولکولی مدرن، برای بررسی اتیولوژی این بیماری در حال بررسی است (27). میکروارناها (miRNAs) مولکولهای کوچک غیر کد شونده هستند که بیان ژنها را در سطح پس از رونویسی و ترجمه تنظیم می کنند که در embryonic heart development، مورفوژنز قلب و رشد سلولهای قلبی وتمایز آنها نقش دارند(28). امروزه تکنیک‌های مداخله‌ای دارویی باعث ترمیم یا تسکین بیشتر نقایص قلبی شده است، اگرچه تعداد قابل توجهی از بیماران، در معرض خطر بالای PAH باقی می‌مانند. به طور سنتی، درمان و مدیریت بیماران PAH-ASD به مراقبت های تسکینی و حمایتی و کارآزمایی های بالینی محدود شده است. با این حال، اخیراً در دسترس بودن درمان پیشرفته ویژه PAH، زمینه جدیدی را برای مدیریت بالینی این بیماری باز کرده است. با این وجود، شواهد محدودی در مورد رویکرد درمانی بهینه برای PAH- ASD وجود دارد(29). تا به امروز، سه مسیر اصلی در پاتوفیزیولوژی PAH شناسایی شده است و به عنوان هدف برای درمان اختصاصی PAH عمل می کند: (1) مسیر اندوتلین، (2) مسیر اکسید نیتریک، و (3) مسیر پروستاسیکلین (29).

آنتاگونیست های گیرنده اندوتلین (ERAs) شامل در حال حاضر قوی‌ترین شواهد برای استفاده از ERAs در درمان PAH-CHD است که به طور قابل توجهی ظرفیت ورزش، همودینامیک و کلاس عملکردی را مستقل از محل نقص سپتوم و بدون به خطر انداختن اشباع اکسیژن، بهبود بخشیدند (30-32). در بررسی توسط Zhao و همکارانش مشخص شد Bosentan به عنوان نوعی از داروهای مسیر اندوتلین، می تواند به طور رقابتی به گیرنده های ET-1 متصل شود و مسیر سیگنالینگ miR 27a/PPARγ/ET-1 را مهار کند، در نتیجه تکثیر PASMC ها را به تاخیر می اندازد و بر توسعه PAH تأثیر می گذارد (33).

تا به امروز، مطالعات کمتری بر روی مهارکننده های فسفودی استراز-5 (PDE-5i)، در PAH- ASD در مقایسه با ERA ها انجام شده است (34). دسته جدیدی از داروهایی که مسیر اکسید نیتریک (NO) را هدف قرار می دهند، محرک های محلول گوانیلات سیکلاز (sGC) هستند که ریوسیگوات اولین داروی تایید شده آن است. آزمایش بر روی محرک گوانیلات سیکلاز محلول در بیماری فشار خون شریانی ریوی شامل 35 بیمار PAH-CHD با نقایص بسته (8٪ از جمعیت مورد مطالعه) بود و ریوسیگوات را در بیماران بدون درمان و بیماران تحت درمان پس‌زمینه ارزیابی کرد. پس از 12 هفته، بهبود ظرفیت ورزش، همودینامیک، NT-proBNP، ک در مقایسه با گروه دارونما مشاهده شد(35).

آنالوگ های پروستاسیکلین داخل وریدی اولین گشادکننده عروق ریوی بودند. در چندین مطالعه، اپوپروستنول داخل وریدی منجر به اثرات مطلوب بر کلاس عملکردی، همودینامیک و ظرفیت ورزش در بیماران PAH-CHD شد اما کاربرد و ایمنی مصرف طولانی مدت داخل وریدی همراه با خطر آمبولی نگرانی هایی را ایجاد می کند. بنابراین، پروستاسیکلین‌های داخل وریدی معمولاً درمان خط اول در PAH-CHD نیستند و محدود به بیماران با عملکرد محدود هستند (36-38).

داروهای اختصاصی PAH-ASD فعلی می توانند پیشرفت بیماری را کاهش دهند، اما نمی توانند به عنوان یک درمان در نظر گرفته شوند. اگرچه در دهه‌های گذشته بسیاری از داروهای متعلق به همان دسته‌ها ساخته شده‌اند، اما شاید باید به دنبال توسعه درمان‌های جدید باشیم ـ که به طور بالقوه می‌توانند PAH را معکوس یا درمان کنند. بنابراین بررسی نشانگرهای حساس زیستی و تاثیرگذار بر مکانیسم اثر دارو، می تواند روش مؤثری جهت تشخیص یا پیش آگهی پاسخ به درمان باشد.

منابع

1) Trojnarska O, Grajek S, Katarzynski S, Kramer L. Predictors of mortality in adult patients with congenital heart disease. Cardiol J. 2009;16:341–7.

2) van der Linde D, Konings EE, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol 2011;58:2241–7.

3) Engelfriet PM, Duffels MG, Moller T, et al. Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. Heart 2007;93:682–7.

4) Yong G, Khairy P, De Guise P, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients with transcatheter closure of secundum atrial septal defects: a longitudinal study. Circ Cardiovasc Interv 2009;2:455–62.

5) Craig RJ, Selzer A. Natural History and Prognosis of Atrial Septal Defect. Circulation 1968;37:805–15.

6) Jain Sh, Dalvi B. Atrial septal defect with pulmonary hypertension: when/how can we consider closure?. J Thorac Dis 2018;10(24):S2890–S2898.

7) Chen W, Li Sh. Circulating microRNA as a Novel Biomarker for Pulmonary Arterial Hypertension Due to Congenital Heart Disease. Pediatr Cardiol.2016

8) Nagy O, Barath S, Ujfalusi A. The role of microRNAs in congenital heart disease.

.eJIFCC.2019;30(2):165-178

Islas JF, Moreno-Cuevas JE. A MicroRNA Perspective on Cardiovascular Development and (9
.(Diseases: An Update. International journal of molecular sciences. 2018;19(7

Jakob Lewin Rukov, Roni Wilentzik, Ishai Jaffe, Jeppe Vinther and Noam Shomron. (10
Pharmaco-miR: linking microRNAs and drug effects. Briefings in bioinformatics. 2012; 15(4):
648-659

Gomez A, Ingelman-Sundberg M. Epigenetic and microrna-dependent control of cytochrome (11
.p450 expression: A gap between DNA and protein. Pharmacogenomics. 2009; 10(7):1067-1076

Zhang W, Huang RS, Dolan ME. Integrating epigenomics into pharmacogenomic studies. (12
.Pharmgenomics Pers Med. 2008; 2008(1):7-14

Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature (13
.2005;435:834-8

Galie N, Beghetti M, Gatzoulis MA, Granton J, Berger RM, Lauer A, Chiossi E, Landzberg M. (14
Bosentan therapy in patients with Eisen[1]menger syndrome: a multicenter, double-blind,
.randomized, placebo[1]controlled study. Circulation 2006;114:48e54

Berger RM, Beghetti M, Galie N, Gatzoulis MA, Granton J, Lauer A, Chiossi E, Landzberg M. (15
Atrial septal defects versus ventricular septal defects in BREATHE-5, a placebo-controlled study
of pulmonary arterial hypertension related to Eisenmenger's syndrome: a subgroup analysis. Int J
.Cardiol 2010;144:373e378

Dimopoulos K, Inuzuka R, Goletto S, Giannakoulas G, Swan L, Wort SJ, Gatzoulis MA. (16
Improved survival among patients with Eisenmenger syndrome receiving advanced therapy for
.pulmonary arterial hypertension. Circulation 2010;121:20e25

Meberg A, Lindberg H, Thaulow E. Congenital heart defects: the patients who die. Acta (17
.Paediatr 2005;94:1060-5

Marelli AJ, Mackie AS, Ionescu-Ittu R et al. Congenital heart disease in the general (18
.population: changing prevalence and age distribution. Circulation 2007; 115: 163-72

Warnes CA, Williams RG, Bashore TM et al. ACC/AHA 2008 guidelines for the management (19
of adults with congenital heart disease: a report of the American College of Cardiology/American
Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines
on the Management of Adults With Congenital Heart Disease). Developed in Collaboration With
the American Society of Echocardiography, Heart Rhythm Society, International Society for Adult
Congenital Heart Disease, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society
.of Thoracic Surgeons. Journal of the American College of Cardiology 2008; 52: e143-263

Gabriels C, De Meester P, Pasquet A et al. A different view on predictors of pulmonary (20
hypertension in secundum atrial septal defect. International journal of cardiology 2014; 176:
.833-40

Martin SS, Shapiro EP, Mukherjee M. Atrial septal defects - clinical manifestations, echo (21
.assessment, and intervention. Clinical Medicine Insights Cardiology 2014; 8: 93-8

Galie N, Manes A, Palazzini M, et al. Management of pulmonary arterial hypertension (22

associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome. Drugs .2008;68:1049-66

(23 Nashat H, Montanaro C, Li W, Kempny A, J. Wort S, Dimopoulos K, A. Gatzoulis M, V. Babu-Narayan S. Atrial septal defects and pulmonary arterial hypertension. J Thorac Dis .2018;10(24):S2953-S2965

(24 G. Strange, D. Playford, S. Stewart et al., "Pulmonary hyper[1]tension: prevalence and .mortality in the Armadale echocardi[1]ography cohort," Heart,2012; 98(24):1805–1811

(25 C. S. P. Lam, B. A. Borlaug, G. C. Kane, F. T. Enders, R. J. Rodeheffer, and M. M. Redfield, "Age-associated increases in pulmonary artery systolic pressure in the gen[1]eral population," .Circulation. 2009; 119(20):2663– 2670

(26 Gajecki D, Gawrys J, Szahidewicz-Krupska E, Doroszko A. Novel Molecular Mechanisms of Pulmonary Hypertension: A Search for Biomarkers and Novel Drug Targets—From Bench to Bed .Site. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020

(27 Posch MG, Perrot A, Berger F, Ozcelik C. Molecular genetics of congenital atrial septal defects. Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society 2010; .99:137-47

(28 Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, Siasos G, Briasoulis A, Vogiatzi G, et al. The role of microRNAs in cardiovascular disease. Curr Med Chem. 2012;19:2605–10

(29 Alexandra C. van Dissel, Barbara J. M. Mulder, Berto J. Bouma. The Changing Landscape of Pulmonary Arterial Hypertension in the Adult with Congenital Heart Disease. J. Clin. Med. 2017, 6, .40

(30 Galie, N.; Beghetti, M.; Gatzoulis, M.A.; Granton, J.; Berger, R.M.; Lauer, A.; Chiossi, E.; Landzberg, M. Bosentan therapy in patients with Eisenmenger syndrome: A multicenter, .double-blind, randomized, placebo-controlled study. Circulation 2006, 114, 48–54

(31 Gatzoulis, M.A.; Beghetti, M.; Galie, N.; Granton, J.; Berger, R.M.; Lauer, A.; Chiossi, E.; Landzberg, M. Longer-term bosentan therapy improves functional capacity in Eisenmenger syndrome: Results of the BREATHE-5 open-label extension study. Int. J. Cardiol. 2008, 127, .27–32

(32 Berger, R.M.; Beghetti, M.; Galie, N.; Gatzoulis, M.A.; Granton, J.; Lauer, A.; Chiossi, E.; Landzberg, M. Atrial septal defects versus ventricular septal defects in BREATHE-5, a placebo-controlled study of pulmonary arterial hypertension related to Eisenmenger's syndrome: .A subgroup analysis. Int. J. Cardiol. 2010, 144, 373–378

(33 Haizhao Zhao, Aili Guo, Minmin Wang, Zhifeng Cai, Xiaoyue Liu, Qingyu Kong, Cuifen Zhao. The Infuence of Bosentan on MicroRNA_27a/PPARγ/ET_1 Signaling Pathway in Pulmonary .Artery Hypertension, Pediatric Cardiology. 2021

(34 Singh, T.P.; Rohit, M.; Grover, A.; Malhotra, S.; Vijayvergiya, R. A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study to evaluate the efficacy of oral sildenafil therapy .in severe pulmonary artery hypertension. Am. Heart J. 2006, 151, 851.e1–851.e5

(35 Ghofrani, H.A.; Galie, N.; Grimminger, F.; Grunig, E.; Humbert, M.; Jing, Z.C.; Keogh, A.M.;

	Langleben, D.; Kilama, M.O.; Fritsch, A.; et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. N. Engl. J. Med. 2013, 369, 330–340. (36 Fernandes, S.M.; Newburger, J.W.; Lang, P.; Pearson, D.D.; Feinstein, J.A.; Gauvreau, K.; Landzberg, M.J. Usefulness of epoprostenol therapy in the severely ill adolescent/adult with Eisenmenger physiology. Am. J. Cardiol. 2003, 91, 632–635. (37 Rosenzweig, E.B.; Kerstein, D.; Barst, R.J. Long-term prostacyclin for pulmonary hypertension with associated congenital heart defects. Circulation 1999, 99, 1858–1865. (38 Thomas, I.C.; Glassner-Kolmin, C.; Gomberg-Maitland, M. Long-term effects of continuous prostacyclin therapy in adults with pulmonary hypertension associated with congenital heart disease. Int. J. Cardiol. 2013, 168, 4117–4121
اهداف: هدف اصلی، اهداف اختصاصی، هدف کاربردی	**اهداف اصلي طرح :** بررسی مکانیسم مولکولی اثر داروهای Endothelin receptor antagonist در درمان بیماری ASD به سمت PAH ASD PAH)) در سطح ژن/ non-coding RNA **اهدف کاربردي طرح:** 1) بررسی و شناسایی ژنهای تأثیرگذار بر مسیر داروهای Endothelin receptor antagonist 2) بررسی و شناسایی non-coding RNAهای تأثیرگذار بر مسیر داروهای Endothelin receptor antagonist 3) بررسی عملکردی ژنها و non-coding RNAهای تأثیرگذار و تأیید ارتباط آنها با مسیر Endothelin receptor در درمان بیماری ASD PAH
فرضیات یا سوالات پژوهشی	1)ژنهای انتخاب شده می توانند بر فاکتورهای مهم دخیل در داروهای Endothelin receptor antagonist اثر گذار باشد. 2) non-coding RNAهای انتخاب شده می توانند بر فاکتورهای مهم دخیل در داروهای Endothelin receptor antagonist اثر گذار باشد. 3) ژنها و non-coding RNAهای تأثیرگذار می توانند در مسیر Endothelin receptor و درمان بیماری ASD PAH دارای عملکرد باشند.
روش اجرا	**1)فاز بیوانفورماتیکی:** در این مرحله با استفاده از پایگاههای داده به بررسی ژنهای مهم در مسیر Endothelin receptor پرداخته و ژنها/ non-codingهای مرتبط با فاکتورهای دخیل در این مسیر شناسایی خواهد شد و ژنها و non-codingهای مرتبط انتخاب خواهد شد. از آنجا که اکثر داروهایی که تاکنون برای درمان بیماری ASD PAH مورد استفاده قرار گرفته است، تاثیر بیشتری بر این مسیر دارد، برای این هدف، ابتدا ژنهای مسیر Endothelin receptor از طریق پایگاه داده KEGG مورد بررسی قرار خواهد گرفت تا مسیر سیگنالینگ و ژنهای بالادست و پایین دست مسیر سیگنالینگ مشخص شود. سپس ژنهایی که داروی مورد نظر بر روی آنها تاثیر بیشتری دارد از طریق پایگاه داده Enrichr جداسازی می شود تا ژن اصلی که در

این مسیر تحت تأثیر قرار خواهد گرفت مشخص شود. در ادامه از طریق پایگاههای داده‌ی ،Targetscan ،miRcode miRanda ،miRWalk ،miRDB و دیگر پایگاههای معتبر که ژنهای هدف miRNAها را پیش بینی خواهد کرد، miRNAهای ژن انتخاب شده در مرحله قبل بررسی خواهد شد. همچنین از طریق پایگاههای داده‌ی مانند Noncode ،lncRRIsearch، بررسی میانکنش lncRNA و ژن مورد نظر بررسی خواهد شد تا در نهایت ژن و non-coding RNA های مد نظر برای ادامه بررسی‌ها مشخص شود.

2) **فاز تیمار دارویی سلولها :**

از آنجا که یکی از سلولهای مناسب و در دسترس برای بررسی این مسیر، سلولهای اندوتلیالی هستند در نتیجه، در این مرحله سلولهای اندوتلیالی ورید ناف انسان (HUVEC) خریداری شده و تحت تیمار با داروهای Endothelin receptor antagonist مانند bosentan و یا macitentan (که از داروهای مهم و مورد استفاده در درمان بیماری ASD PAH هستند) قرار می گیرند. سلول‌های HUVEC کشت شده در محیط حاوی 10% DMEM ،FBS و 100 میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و 100 واحد در میلی لیتر پنی‌سیلین مورد استفاده قرار خواهند گرفت. رده سلولی منجمد را ذوب کرده و 1 میلی لیتر از محیط را به آن اضافه می‌کنیم. سپس در یک لوله فالکون استریل 15 میلی لیتری، محتویات کرایوتوب را انتقال داده و در RPM1200 سانتریفیوژ خواهیم کرد. برای حذف DMSO مایع رویی دور ریخته می‌شود. سپس 5 میلی لیتر از محیط کشت تازه را به رسوب سلولی اضافه کرده و خوب مخلوط می‌کنیم. حالا محتویات لوله فالکون را به یک فلاسک T25تحت شرایط آسپتیک انتقال داده و در دمای 37 درجه سانتیگراد در هوای مرطوب 95٪ و 5٪ CO2 انکوبه خواهیم کرد. پس از رسیدن به 90 درصد confluency ، سلول ها پاساژ داده خواهند شد. برای انجام این کار، محیط کشت برداشته می‌شود و سلول‌ها با 25 متر مربع/ میلی لیتر بافر PBS برای حذف سرم باقیمانده شستشو می‌شوند. محلول بافر را حذف می‌کنیم، سپس 2.5 میلی لیتر تریپسین اضافه می‌شود و سلول ها به مدت 5 دقیقه انکوبه می‌شوند. سپس 2.5 میلی لیتر از محیط کشت اضافه می‌کنیم تا اثر تریپسین خنثی شود. محتویات را به لوله فالکون منتقل و در RPM1200 در 25 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ خواهیم کرد. سپس مایع رویی باید برداشته شود و 2 میلی لیتر از محیط کشت به رسوب سلولی اضافه شود. با استفاده از لام Neubauer شمارش خواهند شد. تعداد سلول‌های زنده در چهار مربع گوشه شمارش خواهند شد و میانگین تعداد سلول‌ها محاسبه خواهند شد. در هر چاهک نزدیک به 500000 سلول برای تجزیه و تحلیل بیشتر نیاز است، و سلول های باقی مانده در دمای 20- درجه سانتیگراد برای استفاده در آینده منجمد می‌شوند.

سپس جهت تأیید میزان دز مورد نظر دارو، با روش
MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) میزان تکثیر سلولی و زنده مانی بررسی می شود. این تست اندازه گیری کمی مرگ سلولی در کشت سلول است که به ارزیابی هرگونه اثرات سیتوتوکسیک یک ترکیب در سلول‌ها کمک می‌کند. برای این سنجش، 5000 تا 8000 سلول را در هر چاهک در پلیت 96 چاهکی کاشته و به مدت بیش از 2 روز (یا ≤ 24 ساعت) طبق پروتکل انکوبه می‌شوند . تمام مایع رویی / محیط را برداشته و سلول ها را با PBS می‌شوییم. سپس 50μL از MTT که در یک محیط به غلظت نهایی 0.5 میلی گرم در میلی لیتر ساخته شده است به چاهک‌ها اضافه کرده و به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه خواهیم کرد تا زمانی که بلورهای داخل سلولی فورمازان بنفش زیر میکروسکوپ قابل مشاهده باشد. سپس MTT را برداشته و 150 میکرولیتر DMSO اضافه می‌کنیم و به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه کرده تا زمانی که سلول ها لیز شوند و کریستال های بنفش حل شوند. سپس جذب را در 570 نانومتر اندازه‌گیری می‌نماییم.

همچنین در ادامه تغییر بیانی ژن و non-coding RNA های انتخاب شده در مرحله بیوانفورماتیک، در گروههای مختلف سلولی (شامل بدون تیمار با دارو، و تیمار با دز بدست آمده توسط روش MTT) مورد آنالیز قرار می گیرد تا تغییر بیانی ژن و non-coding RNA های مد نظر مورد سنجش قرار گیرد. با بررسی میزان معناداری بیان و آنالیز نحوه ی همبستگی ژن و non-coding RNA های انتخاب شده در مرحله بیوانفورماتیک، آن non-coding RNA هایی برای بررسی در مرحله آنالیز عملکرد انتخاب خواهند شد که در فاز سلولی هم، از لحاظ بیانی تغییر بیان معناداری بعد از تیمار داشته و با ژن مورد نظر نیز همبستگی معنادار مثبت و یا منفی داشته باشند. در نتیجه علاوه بر ژن، non-coding RNA های نهایی نیز برای بررسی در مرحله آنالیز عملکردی مشخص خواهد شد.

3)**فاز بررسی عملکرد ژنها/ non-coding RNAهای کاندید شده:**

در این مرحله به بررسی عملکرد ژن و non-coding RNA های نهایی کاندید شده در مسیر موردنظر می پردازیم.

	اگر non-coding RNA انتخابی در این مطالعه در قسمت فاز بیوانفورماتیکی miRNAباشد، باید به صورت آزمایشگاهی تأیید شود که ژن مورد نظر توسط miRNAی انتخابی مورد هدف قرار می‌گیرد. برای این کار، ابتدا باید برای پیش ساز miRNA پرایمرهای مناسب طراحی کرده و بعد از بدست آوردن قطعه مناسب و خالص سازی آن، در وکتور بیانی مناسب دارای سیگنال GFP کلون خواهد شد. همچنین 3´-UTR ژن مورد نظر نیز (به صورت حالت طبیعی و همچنین حالت جهش یافته فاقد جایگاه هدف miRNA که با تکنیک soieng PCR بدست می‌آید) در وکتور مناسب حاوری ژن لوسیفراز کلون خواهند شد. در ادامه مورد هدف قرار گرفتن ژن توسط miRNA نیز با بررسی بیان اگزوژنوس و آنالیز سنجش لوسیفراز و ELISA تأیید خواهد شد. همچنین در بررسی lncRNA، می توان از تکنیک دیگری، به نام تکنیک دست‌ورزی ژنوم (CRSPR/Cas) استفاده کرد. برای رسیدن به این اهداف ، ساخت سازه به منظور knock out و یا knock down آن انجام خواهد شد. در این مرحله gRNA ها برای ژن یا ژنهای مورد نظر با استفاده از نرم افزارهای آنلاین موجود طراحی شده و در سازه مناسب کلون خواهند شد. پس از تکثیر سازه در باکتری و استخراج آن، به منظور صحت ورود توالی مورد نظر از تکنیک colony PCR استفاده شده و به منظور صحت توالی، سازه توالی یابی خواهد شد. در مرحله بعد سازه های حاوی gRNA به سلولهای حساس ترانسفورم می‌شود. انتخاب مثبت نیز علیه یک مارکر انتخابگر برای شناسایی کلونیهای نوترکیب و صحت ترانسفورماسیون انجام خواهد گرفت. صحت کلونیهای نوترکیب توسط direct DNA sequencing بررسی می‌شود. فرایند ترانسفورماسیون با استفاده از Lipofectamin انجام گرفته و میزان ترانسفکشن با بررسی سیگنال GFP در نمونه های کنترل مثبت و انجامPCR و بررسی فلوسایتومتری جهت آنالیز میزان آپوپتوز انجام خواهد شد. در ادامه آنالیز real-time PCR برای non-coding RNAها و ژن انتخابی در سلولهای ترانسفکت شده، انجام خواهد شد تا تأثیر non-coding RNAها بر ژن انتخابی مسیر سیگنالینگ تأثیرگذار بر بیماری و مسیری که شبکه ژنی نیز در آن دخیل است تأیید شود و بتوان تغییرات معنادار non-coding RNAها و ژن را در مرحله موش مدل نیز تأیید نمود. بررسی بیان ژن در هر یک از فازهای مختلف ذکر شده بدین گونه اجرا خواهد شد: ابتدا استخراج RNA سلولها و بافت موش، با پروتکل فنول کلروفرم انجام خواهد گرفت . آنالیز کمی و کیفی نمونه ها توسط نانودراپ اسپکتروفتومتر و ژل الکتروفورز انجام می‌شود و نمونه ها را در دمای 80- درجه سانتیگراد فریز خواهیم کرد. سپس حذف DNA از RNA کل با استفاده از پروتکل آنزیم DNase I انجام می‌شود. در ادامه سنتز cDNA بر اساس پروتکل کیت addbio انجام می‌شود. در انتها نیز از تکنیک real-time PCR با رنگ سایبرگرین برای بررسی بیان ژن/ non-coding RNAهای انتخاب شده، استفاده می‌شود.
مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن	در این مطالعه با استفاده از روش کتابخانهای اطلاعاتی درمورد بیماری ASD و PAH، داروهای Endothelin receptor antagonist مورد استفاده ژنها و non-coding RNA و اهمیت مطالعه آن مورد بررسی قرار می گیرد. در ادامه با انجام مطالعات بیوانفورماتیک و بررسی داده های حاصل از تیمار سلولی، شبکه ی ژنی مورد نظر برای بررسی انتخاب شده و مطالعات عملکردی انجام خواهد شد.
روش محاسبه حجم نمونه و تعدادآن	در این مطالعه نمونه گیری از نمونه های انسانی وجود نخواهد داشت و مطالعات بر روی رده ی سلولی انجام خواهد شد. سلول های انسانی کاملاً غیر قابل انتساب به شخص هستند و با اخذ کد اخلاق مطالعه اجرا خواهد شد.
ملاحظات اخلاقی	سلول هایی که در مطالعه استفاده می شود کاملاً غیر قابل انتساب به شخص هستند و با اخذ کد و موافقت کمیته اخلاق مطالعه شروع خواهد شد.
محدودیتهای اجرایی طرح وروش کاهش آنها	از جمله محدودیتهای اجرای این تحقیق افزایش هزینه خرید مواد آزمایشگاهی و تغییر بسیار زیاد هزینه مواد آزمایشگاهی در بررسی تحقیق خواهد بود.

همچنین در صورت عدم کالیبره بودن دستگاه های لازم جهت انجام آزمایشات پیش بینی شده، بایستی از آزمایشگاههای معتمد جهت پیش برد طرح بهره جست.	

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
میزان تغییرات بیان ژنها و واریانتها در انواع بیمارهای قلبی مورد بررسی		☒	☐	☐	☐	LogFC (logFoldChange)	مقیاسی برای تحلیل تفاوت بیان ژنها در بین دو گروه از نمونه ها می باشد.	نرم افزارهای آنالیز آماری

زمانبندی و اجرا

شرح مختصر مرحله	درصد مرحله	مدت زمان اجرا ـ ماه	از تاریخ	تا تاریخ
سفارش مواد مورد نیاز		2		
فاز بیوانفورماتیکی جهت بدست آوردن ژنها/non-coding RNAهای مرتبط با مسیر		3		
انجام آزمایشات مولکولی شامل: فاز سلولی و تیمار دارویی و تأیید آن، فاز بررسی عملکردی		10		
گزارش آنالیزها و تکرار تست ها در صورت نیاز		5		
نوشتن مقاله و ارسال آن برای ژورنال		4		

هزینه وسایل و مواد مورد نیاز

نوع	نان دستگاه / مواد اولیه	تعداد مورد نیاز	قیمت دستگاه/ وسیله/ مواد ـ ریال	کشور سازنده	شرکت سازنده	شرکت فروشنده	محل تامین اعتبار	جمع کل هزینه به ریال
مصرفی	کیت سنتز Cdna	3	16,000,000					48,000,000
مصرفی	مسترمیکس سایبرگرین ریل تایم	10	6,650,000					66,500,000
مصرفی	کپ استریپ	2	18,000,000					36,000,000
مصرفی	آنزیم Bbsl	1	13,760,000					13,760,000
مصرفی	آنزیم Taq DNA polymerase	2	1,950,000					3,900,000
مصرفی	FBSسرم جنین گاوی	1	10,000,000					10,000,000

هزینه وسایل و مواد مورد نیاز

نوع	نان دستگاه / مواد اولیه	تعداد مورد نیاز	قیمت دستگاه/ وسیله/ مواد ـ ریال	کشور سازنده	شرکت سازنده	شرکت فروشنده	محل تامین اعتبار	جمع کل هزینه به ریال
مصرفی	آنزیم T4 ligase	1	17,970,000					17,970,000
مصرفی	آنزیم DNase I	1	3,000,000					3,000,000
مصرفی	ELISA	2	60,000,000					120,000,000

هزینه آزمایشات و خدمات تخصصی

نام خدمت	نام مؤسسه ارائه کننده خدمت	تعداد یا مقدار لازم	قیمت واحد ـ ریال	قیمت کل ـ ریال
توالی یابی	بیمارستان مرکز قلب شهید رجایی	25	800,000	20,000,000
real-time PCR	بیمارستان مرکز قلب شهید رجایی	40	6,700,000	268,000,000
ELISA	بیمارستان مرکز قلب شهید رجایی	3	6,000,000	18,000,000

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	319,130,000	0	306,000,000	0	0	0	625,130,000