بیمارستان قلب شهید رجایی

بررسی پنل تشخیصی microRNAs در شناسایی بیومارکرهای تشخیصی اختصاصی بیماران دارای نقص دیواره بین دهلیزی (ASD) و فشار خون شریان ریوی (PAH)

شناسنامه طرح

کد رهگیری طرح	4020230
تاریخ تصویب پیش پروپوزال	
عنوان طرح	بررسی پنل تشخیصی microRNAs در شناسایی بیومارکرهای تشخیصی اختصاصی بیماران دارای نقص دیواره بین دهلیزی (ASD) و فشار خون شریان ریوی (PAH)
عنوان لاتین طرح	Investigation of microRNAs panel in for identifying diagnostic biomarkers in patients with ASD and ASD-PAH
تلفن	09165715371
پست الکترونیکی	amirsardari.zahra@yahoo.com
نوع مطالعه	مطالعات علوم پایه
تاریخ شروع	1402/06/01
تاریخ خاتمه	1403/06/31
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	پزشک عمومی
توضیحات	
نوع طرح ها	

مجری همکاران

نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	نوع همکاری	توضیحات
مهشید ملکوتیان	مجری اصلی / نویسنده مقاله	نظارت بر اجرای طرح	
زهرا امیرسرداری	مجری ونویسنده مقاله	بررسی ژنتیک	
اکرم قلی پور	همکار طرح و نویسنده مقاله	بررسی ژنتیک	
مجید ملکی	همکار طرح	نظارت بر اجرای طرح	
زهرا خواجعلی	همکار طرح	ارزیابی بالینی بیماران	
سیده ضحی طباطبایی	همکار طرح	نظارت بر اجرای طرح	

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 (4). 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 (5). فشار شریان ریوی (PAH) به عنوان فشار سیستولیک شریان ریوی (PASP≥40mmHg) در 6 الی 35 درصد از بیماران ASD دیده می شود (6،7) که می تواند منجر به heart failure و افزایش مرگ و میر شود(8). 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(9). بنابراین، بازسازی انسداد دیواره عروق ریه باید در مرحله اولیه ارزیابی شود تا نرخ درمان بیماران مبتلا افزایش یابد (10). تا کنون مطالعه ای در ارتباط با بدست آوردن بیومارکرهای اختصاصی مرتبط با بیماران ASD که مبتلا به PAH می شوند، صورت نگرفته است و توسعه بیومارکرهای تشخیصی ASD-PAH به صورت یک چالش باقی مانده است. 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 شده‌اند(11). 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 (12). با گسترش علم ژنتیک مولکولی و یافتن اساس ژنتیکی بیماری های قلبی مانند ASD و PAH، بسیاری از محققان امیدوارند بتوانند با رهگیری و بررسی مکانیسم‌ها و شبکه‌های مولکولی دخیل در ایجاد بیماری ها، مداخله گرهای ژنتیکی که در مراحل ابتدایی بروز بیماری نقش دارند را شناسایی کنند. این مداخله‌گرهای ژنتیکی را می توان پس از تایید در مطالعات جمعیتی، به عنوان بیومارکر برای تشخیص بیماری در مراحل اولیه و پیش از پیشرفت علایم بالینی به کار برد. امروزه بررسی پروفایل بیانی ژن‌های کدکننده و غیر کننده، به طور گسترده ای در تحقیقات بیولوژیکی استفاده می‌شود که منجر به پیشرفت قابل توجهی در درک مکانیسم های مولکولی اختلالات پیچیده، از جمله سرطان ، بیماری های قلبی

	و اختلالات متابولیکی شده است. بر این اساس می توان با تعیین پروفایل بیانی ژنها در نمونه‌های ترشحی در فرآیند بیماری مانند نمونه‌های خون ، ژنهای تغییر بیان یافته و مرتبط با بیماری را شناسایی نمود. رهگیری بیان این عوامل در جمعیت بیماران، به ما در شناسایی بیومارکرها و شبکه‌های تنظیمی تشخیصی و اختصاصی بیماری ASD و PAH کمک می‌کند.
ضرورت اجرا	امروزه حتی با وجود اکوکاردیوگرافی جنینی به عنوان یک ابزار غربالگری برای نقایص قلبی مادرزادی، نرخ نادیده گرفته شدن نقایص قلبی بین 6 تا 35 درصد است (1،2). بعلاوه به دلیل عدم استاندارد سازی نتایج، نتایج اولتراسوند از مرکزی به مرکز دیگر متفاوت می‌باشد (3). پیش بینی ریسک بروز اختلالات مادرزادی قلبی قبل از بارداری یا قبل از تولد جنین همواره به عنوان یک چالش بزرگ در حوزه ی پزشکی محسوب شده است . بنابراین بدست آوردن بیومارکرهای تشخیصی و پروگنوستیک برای هریک از بیماریهای مادرزادی قلبی، کلیدی برای کاهش مورتالیتی و موربیدتی این بیماریهای و نیز بهبود پیش آگهی بیماران می باشد. Atrial septal defect (ASD)یکی از شایع ترین بیماریهای مادرزادی قلبی است عدم تشخیص و درمان به موقع این بیماری منجر به افزایش فشار در قلب راست شده که این افزایش فشار نهایتا منجر به افزایش فشار شریان ریوی Pulmonary arterial hypertention) (PAH) می‌شود . ASD عمدتا تا نوجوانی بی علامت است و تشخیص آن در سن های پایین عمدتا بصورت تصادفی اتفاق می افتد ولی با گذشت زمان سایز دیفیکت بزرگتر شده و افزایش فشار شریان ریوی و نارسایی قلب راست ایجاد میشود که این موضوع منجر به علامت دار شدن بیماران میشود. علائم شامل تنگی نفس فعالیتی ، درد قفسه سینه ی فعالیتی و خستگی میباشد. بررسی نشانگرهای حساس زیستی و غربالگری دقیق و همچنین بررسی مارکرهای مولکولی مناسب می‌تواند روش مؤثری جهت تشخیص یا پیش آگهی این بیماری باشد. بررسی پروفایلهای بیانی(ترنسکریپتومیک پروفایل ، پروتئومیک پروفایل و متابولومیک پروفایل) در بیماران ASD-PAHبا استفاده از نمونه در دسترس مانند خون تام، سرم، پلاسما ، می‌تواند در تشخیص ، پیشگیری و درمان این بیماران نقش های مهمی ایفا کند . فناوریهای نوین توالی یابی یک روش دقیق برای دستیابی نشانگرهای زیستی است که خطر بیماری‌ها را پیش بینی می‌کند. پروفایل گیری وضعیت بیان miRNAها در بیماران ASD-PAH، دو نتیجه اصلی دربر خواهد داشت: مسیر مولکولی و شبکه‌های ژنی دخیل در این بیماری، شفاف‌تر شده وثانیاً می‌توان بازیگران جدیدی را جهت تشخیص و درمان 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 (13). بیماری ASD به عنوان دومین نقایص مادرزادی قلبی شایع در جهان می باشد و براساس درگیری ساختاری قلبی به زیرگروههای مختلفی تقسیم می‌شود 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 می‌دهد (14،15). این بیماری با فشار شریان ریوی، right heart failure، atrial fibrillation و سکته مرتبط است (16،17) . اتیولوژی بیماری ASD در بیشتر موارد، ناشناخته باقی مانده است در نتیجه بررسی و مطالعات دقیق برای بدست آوردن فاکتورهای خطر اختصاصی ضروری است (18). 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 (19). به طور کلی بیماران ASD که همراه با PAH می باشند، با میزان مرگ بالایی همراه بوده و باید تحت نظارت دقیق قرار گیرند (20). تخمین میزان دقیق شیوع PAH به علت اتیولوژی پیچیده‌ی آن بسیار مشکل است اما بعضی مطالعات نشان داده که میزان شیوع آن 6.6% است (21،22). 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 (23). روشهای ژنتیکی بر پایه تکنیکهای مولکولی مدرن، برای بررسی اتیولوژی این بیماری در حال بررسی است (24). 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 (25). در سال 2008 مشخص شد که miRNAها در مایعات بیولوژیک مانند سرم و پلاسما و با پایداری بالا حضور دارند (26). همچنین تعدادی از مطالعات مشخص کردند که miRNAهای circulate می توانند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی و پیش گویی برای بیماریهای قلبی باشند (27،28).

در بررسی که توسط Chen و همکارانش انجام شد، بیان miRNAهای miR-130a ،miR-19a و miR-27b در 14 نمونه بیماران ASD دارای PAH و 16 سمپل ASD بدون PAH بررسی کردند و مشخص شد بیان miR-19a در بیماران دارای PAH افزایش داشت (7). در مطالعه ای توسط Song و همکارانش مشخص شد که بیان miRNAهای has-let-7b ،has-let-7a و miR-486 در کودکان دارای نقص ASD افزایش بیان داشتند (29). مشخص شده است که Overexpress کردن دو miRNAی let-7a و let-7b باعث مهار HAND1 شده و باعث تخریب امبریوژنز قلبی می شود که آنها را یک بیومارکر مهم برای تشخیص ASD می¬کند. همچنین miR-486 با هدف قرار دادن دو ژن PTENو FOXO1، مسیر PI3K/Akt را تحت تأثیر قرار داده و باعث muscle hypertrophic growth خواهد شد (30،31). در بررسی دیگر مشخص شد که بیان کلاستر miR-17-92 و کلاستر miR-106b-25 در گروه بیماران ASD، کاهش بیان دارند (32).

Courboulin و همکارانش مشخص کردند که miR-204 در بیماران PAH کاهش بیان می یابد (33). Rhodes و همکاران با آنالیز ماکرواری miRNAها بر روی پلاسمای بیماران PAH نشان دادند که miR-150 به صورت معناداری کاهش می یابد (34). سایر مطالعات نشان دادند که miR-21، miR-143/145، miR-17-92 در بیماران PAH تغییر بیان خواهند داشت (35-38). افزایش بیان miR-124 باعث مهار تکثیر PASMC شده و در نتیجه می تواند در توسعه درمان بیماران PAH نقش داشته باشد (39). مطالعات نشان داده که مسیر APLN-miR-424/503-FGF در پاتوژنز بیماری PAH نقش ضروری دارند (40).

با وجود بررسیهای انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر بررسی miRNAهای دارای تفاوت بیان بین گروه ASD و PAH صورت نگرفته است.

منابع

1) Jaeggi ET, Sholler GF, Jones OD, Cooper SG. Comparative analysis of pattern, management and outcome of pre- versus postnatally diagnosed major congenital heart disease: a population-based study. Ultrasound Obstet Gynecol 2001;17: 380–5

2) Garne E, Stoll C, Clementi M. Evaluation of prenatal diagnosis of congenital heart diseases by ultrasound: experience from 20 European registries. Ultrasound Obstet Gynecol 2001;17:386–91.

3) Friedberg MK, Silverman NH, Moon-Grady AJ, et al. Prenatal detection of congen[1]ital heart disease.J Pediatr 2009;155:26–31 [31].

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

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) Craig RJ, Selzer A. Natural History and Prognosis of Atrial Septal Defect. Circulation

.1968;37:805–15

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

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

(11 Nagy O, Barath S, Ujfalusi A. The role of microRNAs in congenital heart disease. .eJIFCC.2019;30(2):165–178

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

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

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

(15 Warnes CA, Williams RG, Bashore TM et al. ACC/AHA 2008 guidelines for the management 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

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

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

(18 Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American .Academy of Pediatrics. Circulation 2007; 115: 2995–3014

(19 Galie N, Manes A, Palazzini M, et al. Management of pulmonary arterial hypertension associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome. Drugs .2008;68:1049–66

(20 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

(21 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

(22 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

Gajecki D, Gawrys J, Szahidewicz-Krupska E, Doroszko A. Novel Molecular Mechanisms of (23 Pulmonary Hypertension: A Search for Biomarkers and Novel Drug Targets—From Bench to Bed .Site. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020

Posch MG, Perrot A, Berger F, Ozcelik C. Molecular genetics of congenital atrial septal (24 defects. Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society 2010; .99:137-47

Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, Siasos G, Briasoulis A, Vogiatzi G, et al. The (25 role of microRNAs in cardiovascular disease. Curr Med Chem. 2012;19:2605–10

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjan[1]yan EL, et al. (26 Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:10513–8

McManus DD, Ambros V. Circulating microRNAs in cardiovascular disease. Circulation. (27 .2011;124:1908–10

Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomark[1]ers or mediators (28 of cardiovascular diseases? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:2383–90

Song Y, Higgins H, Guo J, Harrison K, Schultz E, J. Hales B, K. Moses E, Goldblatt J, Pachter (29 N, Zhang G. Clinical signifcance of circulating microRNAs as markers in detecting and predicting congenital heart defects in children. J Transl Med (2018) 16:42

Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, et al. Regulation of (30 PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched micro[1]RNA-486. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:4

uby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remod[1]eling. Annu Rev Biochem. (31 .2006;75:19–37

Han Sh, Wang W, Duan L, Hou Z, Zeng J, Li L, Yao M, Zhang Y, Wang Y, Xie Y, Wang H, Zu (32 L, Li Y, Jian L. MicroRNA profiling of patients with sporadic atrial septal defect. Biotechnology and .biotechnological equipment. 2019; 33(1), 510–519

Courboulin A, Paulin R, Gigu `ere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel (33 S, Provencher S, Cot ´ ˆ e J, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. J Exp Med 2011;208:535–548

Rhodes CJ, Wharton J, Boon RA, Roexe T, Tsang H, Wojciak-Stothard B, Chakrabarti A, (34 Howard LS, Gibbs JSR, Lawrie A, et al. Reduced microRNA-150 is associated with poor survival .in pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med 2013;187:294–302

Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, Savai R, Kojonazarov B, Dahal BK, Ghofrani HA, (35 Weissmann N, Grimminger F, Bonauer A, et al. Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med 2012;185:409–419

Caruso P, Dempsie Y, Stevens HC, McDonald RA, Long L, Lu R, White K, Mair KM, McClure (36 JD, Southwood M, et al. A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from

	mouse models and patient samples. Circ Res 2012;111:290–300 (37 Joshi SR, McLendon JM, Comer BS, Gerthoffer WT. MicroRNAs[1]control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease. Pulm Circ 2011;1:357–364. (38 Parikh VN, Jin RC, Rabello S, Gulbahce N, White K, Hale A, Cottrill KA, Shaik RS, Waxman AB, Zhang YY, et al. MicroRNA-21 integrates pathogenic signaling to control pulmonary hypertension: results of a network bioinformatics approach. Circulation 2012;125:1520–1532. (39 Kang K, Peng X, Zhang X, Wang Y, Zhang L, Gao L, Weng T, Zhang H, Ramchandran R, Raj JU, et al. MicroRNA-124 suppresses the transactivation of nuclear factor of activated T cells by targeting multiple genes and inhibits the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. J Biol Chem 2013;288:25414–25427. (40 Zhou G, Chen T, Raj J. MicroRNAs in Pulmonary Arterial Hypertension. Translational Review.2015
اهداف: هدف اصلی، اهداف اختصاصی، هدف کاربردی	**اهداف اصلي طرح :** بررسی تغییرات پروفایل بیانی miRNAها در خون افراد مبتلا به بیماری نقص سپتوم دهلیزی (ASD) و فشار شریان ریوی (PAH) جهت بدست آوردن بیومارکرهای اختصاصی در توسعه بیماری ASD به سمت PAH **اهدف کاربردي طرح :** 1) شناسایی miRNAهای با بیان متفات در نمونه خون بیماران ASD و ASD-PAH 2) بررسی اعتبار miRNAهای کلیدی شناسایی شده به عنوان بیومارکر برای تشخیص بیماری ASDتوسعه یافته به سمت PAH
فرضیات یا سوالات پژوهشی	ایا miRNAهای کاندید شده می‌توانند با توسعه بیماری ASD به سمت PAH و مسیرهای ایجاد کننده‌ی این بیماری ارتباط داشته باشند.؟ ایا تغییر بیان miRNAهای کاندید را می توان به عنوان بیومارکری برای تشخیص زودهنگام بیماری ASD-PAH ارائه داد؟
مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن	در این مطالعه با استفاده از روش کتابخانه‌ای اطلاعاتی درمورد بیماری ASD و miRNA، PAHهای دخیل در آن و اهمیت مطالعه آن مورد بررسی قرار می گیرد. سپس با استفاده از پرسشنامه و اخذ رضایت نامه آگاهانه از بیماران، نمونه های خون بیماران با همکاری تیم اینترونشنال کاردیولوژیست بیمارستان قلب شهید رجایی جمع آوری خواهد شد. در ادامه با انجام مطالعات بیوانفورماتیک و بررسی داده‌های miRNA-seq ، پنل miRNA های مورد نظر برای بررسی در بیماران انتخاب شده و مطالعات عملکردی انجام خواهد شد.
روش اجرا	1. فاز بیوانفورماتیکی:

در ابتدا پایگاههای داده جهت بدست آوردن مطالعات بیوانفورماتیکی miRNA-sequencing و RNA-sequencing مورد بررسی قرار خواهد گرفت. سپس، داده‌های fastq ذخیره و به منظور حذف خوانشهای ناقص و لینکرها، با نرم افزارهایی trimm داده‌های خام انجام می‌شود. سپس خوانشهای مناسب ، با استفاده از الاینر bowtie1، خوانش‌ها با ژنوم انسان (hg38) الاین می‌شوند. در مرحله بعد فایلهایی با فرمت BAM، ذخیره سازی شده و از نرم افزار IGV جهت مشاهده صحت آنها استفاده می شود. سپس باید با استفاده از htseq-cout فرآیند کمی سازی خوانش‌های الاین شده با ژنوم انجام می‌شود. در نهایت نیز برای بررسی ژنهای با بیان متمایز ، از پکیج DEseq2 در فضای برنامه نویسی R استفاده خواهد شد و لیستی از miRNAها به دست خواهد آمد. سپس مراحل بررسی miRNA های دارای تفاوت بیان در مسیرهای سیگنالینگ مهم بررسی شده بر روی بیماران انتخاب می‌شوند. در نهایت پنلی از miRNAها برای بررسی بر روی بیماران انتخاب خواهد شد.

2. فاز جمع آوری نمونه های بیماران :

برای بررسی و مقایسه پروفایل بیماران، تعداد 36 نمونه سرم از بیماران دارای ASD و 36 نمونه سرم افراد ASD پیشروی کرده به سمت PAH جمع آوری خواهد شد که با تأیید متخصصین قلب این فرآیند انجام می‌شود. برای انجام این مرحله با استفاده از روش سرشماری و همچنین تهیه پرسشنامه و مطالعه ی پرونده ی بیماران، نمونه ها جمع آوری می شوند. خصوصیات ورود به مطالعه شامل تشخیص تایید شده ی ASDو یا ASD/PAH توسط اکوکاردیوگرافی یا CMR توسط حداقل دو مختصص قلب، دسترسی به پرونده ی بیمار ، دسترسی به نمونه ی خون کامل بیمار و خصوصیات خروج از مطالعه شامل وجود اختلالات سندرمی (از جمله تریزومی ها و مونوزوی ها) , وجود سایر اختلالات مادرزادی قلب (از جمله VSD ، نقایص دریچه ای ، بیماریهای سیناتیک قلبی ،PDA)، وجود اختلالات متابولیک و اندوکرین می باشد. برای جمع آوری نمونه سرم بیماران در این بررسی، پس از اخذ رضایت نامه در حدود 5-8 میلی لیتر خون بیماران در لوله های ژل دار مخصوص جداسازی سرم قرار داده شد. و برای جداسازی سرم نمونه های دریافت شده به مدت 30 دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند تا فاز سرم جداشود. سپس به مدت 15 دقیقه در دور g 2500 سانتریفیوژ شدند. نمونه سرم جداسازی شده به لوله های RNAse free منتقل و در منفی 80 درجه سانتیگراد ذخیره شد.

3. فاز طراحی پرایمر و بهینه سازی واکنش real-time PCR

برای طراحی پرایمرهای miRNAها از روش stem-loop و نرم افزار gene runner استفاده شد و همچنین از پایگاههای داده‌ی NCBI blast و Oligo Analyzer جهت طراحی پرایمرهای مورد نظر استفاده شد. توالی پرایمرها، جهت سنتز ارسال خواهند. همچنین ژنهای 5s به عنوان کنترل داخلی (ژن مرجع) انتخاب خواهد شد. در ادامه با استفاده از پایگاههای داده بررسی بیان miRNA، رده های سلولی که miRNAهای مورد نظر در آن بیان می شوند انتخاب خواهد شد تا پرایمرها بهینه سازی شوند. در این پژوهش برای استخراج RNA سلولهای مورد استفاده در این تحقیق، از ماده RiboEx (#GA-301-001 ,GeneAll, South Korea) استفاده شد. استخراج RNA سلولها از فلاسک T25 با 1500000 سلول انجام پذیرفت. استخراج RNA با استفاده از مواد و وسایل عاری از RNase و زیر هود شیمیایی و طبق پروتکل استخراج فنول ـ کلروفرم انجام می‌شود. در ادامه جهت حذف آلودگی احتمالی استخراج شده به DNA ژنومی، نمونه‌ها پیش از استفاده جهت ساخت cDNAبا آنزیم DNase I (سیناکلون) تیمار شده و با استفاده از روش Stem-loop ، سنتز cDNA اختصاصی انجام می شود.

جهت بهینه سازی پرایمرهای طراحی شده برای miRNNAها و ژن هدف آنها، واکنش PCR بر روی رده‌های سلولی مورد نظر انجام خواهد شد و بعد از تک باند شدن آن بر روی ژل الکتروفورز و تایید توالی پرایمرها توسط تکنیک توالی یابی، واکنش real-time PCR برای بررسی میزان بیان انجام می گیرد.

4. فاز بررسی بیان پنل miRNAهای انتخابی و تایید آنها به عنوان بیومارکر

سپس از نمونه های جمع آوری شده، RNA استخراج می شود و صحت تغییر بیان miRNAهای کاندید شده ، با کمک real-time PCR در کلیه نمونه ها بررسی خواهد شد. در این مرحله نمونه های سرم با استفاده از کیت (NORGEN cat.no.55040,Canada) استخراج و جهت تغلیظ نمونه های RNAهای استخراج شده و افزایش غلظت و خلوص آنها از کیت concentration کمپانی نورژن (,canada cat. No. 61000) استفاده خواهد شد. مراحل سنتز cDNA و

	real-time PCR برای miRNAهای کاندید شده انجام خواهد شد. سپس میزان بیان miRNAهای مورد نظر با استفاده از روش 2-ΔΔCt برای آنالیز داده های real-time PCR استفاده شده و نرم افزار GraphPad Prism 6 نیز برای آنالیز آماری داده های real-time PC و رسم نمودار ROC curve جهت تایید صحت قابلیت بیومارکری miRNAهای انتخابی استفاده خواهد شد.
روش محاسبه حجم نمونه و تعدادآن	در این مطالعه از دو گروه بیماران ASD و افراد ASD توسعه یافته به سمت PAH نمونه خون تهیه خواهد شد. تعداد حجم نمونه حداکثر نمونه ی در دسترس خواهد بود . که بعد از پر شدن فرم رضایت نامه آگاهانه توسط افراد مشارکت کننده، 5 سی سی از نمونه خون فرد جدا شده و سرم آن جدا می شود و برای فرآیند استخراج RNA به آزمایشگاه مربوطه برده خواهد شد.
ملاحظات اخلاقی	جهت جمع آوری نمونه های خون ، قبل از شروع کار نمونه گیری، ابتدا مراحل دریافت کد اخلاق و همچنین تهیه فرم رضایت نامه برای بیماران مایل به شرکت در این طرح پژوهشی، انجام خواهد گرفت. فرم رضایت اگانه از والدین/ قیم قانونی بیماران در فایل ضمیمه قابل مشاهده است . با توجه به اینکه نتایج این مطالعه بصورت فردی برای بیماران بعنوان تست تشخیصی یا پیش اگهی کنده ارزشی ندارد و فقط مجموع داده های بیماران ارزش تحقیقاتی دارد نتایج به صورت فردی در اختیار بیماران قرار نخواهد گرفت (نتایج مطالعات ژنی ممکن است بصورت فردی برای بیماران مفید باشد ولی نتایج بررسی های RNA های غیر کد کننده با توجه به علم حال حاضر به صورت فردی برای این بیماران و خانواده ی انها کاربردی ندارد)
محدودیتهای اجرایی طرح وروش کاهش آنها	از جمله محدودیتهای اجرای این تحقیق، جمع آوری نمونه‌های ASD و افراد ASD توسعه یافته به سمت PAH می باشد که باید تعداد نمونه‌های مورد نظر با رضایت بیماران انجام شود .این موضوع می تواند سرعت جمع آوری بیماران را کاهش دهد. همچنین تغییر بسیار زیاد هزینه مواد آزمایشگاهی نیز از جمله محدودیتهای مهم در بررسی تحقیق خواهد بود.
معیارهای ورود (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد
معیارهای خروج (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد
چگونگی تصادفی سازی و Concealment (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد
تعریف گروه مداخله (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد
تعریف گروه شاهدیامقایسه (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد
چگونگی کورسازی (Blinding) (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد

پیامدها اولیه (primary) ثانویه (secondary) ایمنی (Safety) (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد
پیگیری (follow up) (فقط مربوط به طرحهای کارآزمایی بالینی)	مطالعه کار ازمایی بالینی نمیباشد

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
سن بیمار		☒	☐	☐	☐	ماه	ماه های گذشته از تولد بیمار	پرونده ی بیمار
جنس بیمار		☐	☐	☐	☒	مرد /زن	جنسیت بیمار بر حسب فنوتیپ	پرونده ی بیمار
نوع بیماری		☐	☐	☐	☒	ASD OR ASD-PAH	وجود نقص سپتوم بین دهلیزی به تنهایی / وجود نقص سپتوم بین دهلیزی همراه با افزایش فشار شریان ریوی	اکوکاردیوگرافی ثبت شده در پرونده ی بیمار
سایز دیفکت سپتوم بین دهلیزی		☒	☐	☐	☐	میلی متر	سایز دیفکت سپتوم بین دهلیزی	اکوکاردیوگرافی

زمانبندی و اجرا

شرح مختصر مرحله	درصد مرحله	مدت زمان اجرا ـ ماه	از تاریخ	تا تاریخ
نمونه گیری		1		
مرحله بیوانفورماتیکی		1		
مرحله ی ازمایشگاهی شامل ست اپ پرایمرها real time pcr نمونه ها		11		
انالیز داده ها		1		

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	4	35,000,000					140,000,000
مصرفی	سایبرگرین High rox	15	12,000,000					180,000,000
مصرفی	کپ و استریپ	5	22,000,000					110,000,000
مصرفی	آنزیم Taq polymerase	2	195,000					390,000
مصرفی	oading buffer	2	1,200,000					2,400,000
مصرفی	Ladder 50bp	1	1,000,000					1,000,000
مصرفی	آنزیم DNase I	1	6,200,000					6,200,000
مصرفی	کیت استخراج RNA	2	127,400,000					254,800,000
مصرفی	پرایمرهای مورد نظر	420	70,000					29,400,000

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		10	1,800,000	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	724,190,000	0	18,000,000	0	0	0	742,190,000