

## پیش‌بینی روش‌های نوین تشخیص و درمان فشار خون شریانی ریوی با استفاده از روش‌های سیستم بیولوژی

علی سالاری<sup>۱\*</sup>، فاطمه سالاریان<sup>۲</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری فشار خون شریانی ریوی، بیماری رگ‌های نازک بوده که با فشار بالا و تنگی رگ‌ها همراه است و نهایتاً در بطن راست اختلال ایجاد می‌کند. این مطالعه با هدف یافتن روش‌های نوین مناسب تشخیصی و درمانی با استفاده از روش‌های مختلف سیستم بیولوژی و بیوانفورماتیک انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه داده‌های میکرواری دو گروه (گروه سالم به‌عنوان کنترل و گروه فشار خون شریانی ریوی به‌عنوان گروه بیمار) توسط نرم افزار GEO2R مقایسه شد. همچنین بررسی‌های پروتئین کینازی، فاکتورهای رونویسی، واکنش‌های پروتئینی، microRNA و دارویی به ترتیب توسط پایگاه‌های داده‌ای ChEA، KEA، Gene2Network، TargetScan microRNA، و Connectivity Map (CMAP) بر روی دو دسته ژن‌های افتراقی انجام گرفت. در نهایت، با اطلاعات به‌دست آمده، شبکه پروتئینی ژن‌های افتراقی فشار خون شریانی ریوی کشیده شد.

**یافته‌ها:** فاکتورهای رونویسی SUZ12، SP1 و فاکتور رونویسی MYC به ترتیب به‌عنوان فاکتورهای رونویسی مهم ژن‌های افزایش بیان یافته و کاهش بیان یافته، پیش‌بینی و گزارش شدند. همچنین کیناز PAK3 و کیناز IRAK3 به ترتیب به‌عنوان کینازهای مهم ژن‌های افزایش بیان یافته و کاهش بیان یافته پیش‌بینی و کاندید درمان گزارش شد. به‌طور خلاصه پروستاگلاندین جی ۲ (PGI<sub>2</sub>) با دوز ۰/۰۰۰۰۱ مولار با مدت زمان هر ۶ ساعت یک‌بار و microRNAهای miR-501 و miR-144 برای مهار ژن‌های افزایش بیان یافته بیماری فشار خون شریانی ریوی، پیش‌بینی و به‌عنوان کاندید درمان گزارش شدند.

**نتیجه‌گیری:** با استفاده از ابزارهای سیستم بیولوژی می‌توان مسیر جدیدی را در راستای تشخیص و درمان بیماری فشار خون شریانی ریوی به کمک مارکر PAK3، miR-144، miR-501 و داروی پروستاگلاندین J<sub>2</sub> نشان داد.

**کلید واژه‌ها:** فشار خون شریانی ریوی؛ نقشه‌های فعل و انفعالات پروتئین؛ دارودرمانی؛ میکروآران‌آهای درمانی؛ سیستم بیولوژی.

<sup>۱</sup>باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

<sup>۲</sup>دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، قم، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

**علی سالاری**، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

asalari1365@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۲۶

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Salari A, Salarian F. Prediction of new diagnostic and therapeutic approaches in pulmonary arterial hypertension by system biology methods. Qom Univ Med Sci J 2016;10(5):9-20. [Full Text in Persian]

## مقدمه

دیواره رگ‌های ریوی بسیار نازک بوده و به‌طور معمول سرعت عبور جریان در آنها بالا و فشار خون پایین است (۱). بیماری فشار خون شریانی ریوی (Pulmonary Arterial Hypertension, PAH) بیماری عروق تنگ است که عواملی چون تنگی عروق و افزایش مقاومت عروق ریوی با اختلال در بطن راست به ایجاد بیماری کمک می‌کنند. از علائم بیماری می‌توان به انقباض عروق و گسترش عروق و بازسازی رگ‌های ریوی اشاره کرد (۲، ۳)، که دلایل آن تقریباً مشخص است. به‌طور مثال انقباض عروق می‌تواند به علت اختلال در سیستم کانال‌های پتاسیمی و ناکارآمد بودن عملکرد اندوتلیال باشد (۴). یک فاکتور، عامل ایجاد PAH نیست؛ بلکه عوامل مختلفی در ایجاد این بیماری نقش دارند (۶-۴). اما در مطالعات دیگر از نظر درمانی، عوامل مختلفی به عنوان پتانسیل درمانی فشار خون شریانی ریوی گزارش شده‌اند. همچنین Petkov و همکاران (سال ۲۰۰۳) در مطالعه خود پپتید روده‌ای وازواکتیو (Vasoactive Intestinal Peptide) را به دلیل قابلیت مهار فعالیت پلاکت‌ها، همچنین دارابودن قابلیت تولید عروق خونی سلول‌های ماهیچه‌های صاف و گشادای عروق، به عنوان درمان فشار خون شریانی ریوی گزارش کردند (۸). Eddahibi و همکاران (سال ۲۰۰۱) و Marcos (سال ۲۰۰۴)، مهارگرهای انتخابی بازجذب سروتونین را به علت افزایش مقاومت نسبت به بیماری فشار خون شریانی ریوی، به عنوان درمان پیشنهاد کردند (۹، ۱۰). سؤال مطرح در این زمینه این است که کدام مکانیسم‌های مولکولی دیگر در این بیماری نقش دارند، و کدامیک آغازگر آشبار اتفاقات خواهند بود؟ و مهم‌ترین پروتئین این شبکه کدام است؟ به همین جهت در مطالعه حاضر برای پاسخ به سؤالات فوق، از ابزارهای بیوانفورماتیک و سیستم بیولوژی برای یافتن مکانیسم‌های مولکولی مجهول و پروتئین‌های کلیدی شبکه و عوامل مؤثر بر بیماری استفاده شد (۱۱). همچنین با روش‌های دارودرمانی و مولکول‌درمانی، درمان‌های نوینی پیشنهاد گردید.

## روش بررسی

**آنالیز داده‌های میکروآرای:** داده‌های ماکروآرای با شناسه GSE60037 از پایگاه NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) از قسمت GEO (Gene expression Omnibus) استخراج و سپس دو گروه نرمال (سالم) و تیمار PAH (فشار خون شریانی ریوی) با هم مقایسه شدند. گروه سالم به عنوان کنترل و گروه PAH به عنوان تیمار در نظر گرفته شد. در این مقایسه تعداد نمونه‌های کتابخانه‌های میکروآرای برای گروه کنترل، ۸ عدد و برای PAH نیز ۸ عدد در نظر گرفته شد و مقایسه با برنامه GEO2R (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r) انجام گرفت (۱۲).

**آنالیز عملکردی ژن‌های افتراقی:** پس از آنالیز داده‌های میکروآرای، دو دسته ژن (یکی ژن‌های افزایش بیان یافته و یکی ژن‌های کاهش بیان یافته) به دست آمد.

آنالیزهای سه‌گانه (Biological process, Molecular function, Cellular component) بر روی ژن‌های Differential DEGs (Expression genes)، به وسیله پایگاه Enrichr استخراج شد (۱۳).

**آنالیز OMIM Disease:** در این آنالیز با استفاده از برنامه Enrichr (www.amp.pharm.mssm.edu/Enrichr) از پایگاه OMIM، بیماری‌هایی که ژن‌هایی با بیان افتراقی دارای عملکرد بودند استخراج شدند (۱۳).

**آنالیز فاکتورهای رونویسی:** استخراج فاکتورهای رونویسی ژن‌های افتراقی از ۴ پایگاه آنالیزی فاکتورهای رونویسی

Transcription Factor PPIs, TF-LOF Expression from GEO, ChEA (ChIP Enrichment Analysis), ENCODE TF ChIP-seq 2015

(Protein-protein Interaction) استخراج و سپس مشترکات

آنها گزارش گردید (۱۳-۱۵).

**آنالیز پروتئین کینازها:** پروتئین کینازهای مرتبط با پروتئین‌های حد واسط یافت شده در مرحله قبل به وسیله

برنامه KEA (Kinase Enrichment Analysis) یافت و استخراج شد (۱۵).

بررسی‌های فوق نشان داد در هنگام ابتلا به فشار خون شریانی، ۶۲ ژن بیان افزایش معنی‌داری و ۴۸ ژن کاهش بیان معنی‌داری دارند. **آنالیز عملکرد مولکولی ژن‌های افتراقی:** در این مطالعه، پیش‌بینی عملکرد مولکولی ژن‌های افتراقی نشان داد ژن‌های افزایش بیان‌یافته در عملکردهای Arylsulfatase Activity و Sulfuric Ester Hydrolase Activity، بیشترین امتیاز را به خود اختصاص دادند (جدول مکمل ۳)، درحالی‌که ژن‌های افتراقی کاهش بیان‌یافته، بیشترین امتیاز را در عملکردهای Histone demethylase و Demethylase داشتند (جدول مکمل ۴).

**آنالیز اجزای سلولی:** نتایج بررسی مکان حضور ژن‌های افتراقی گروه ژن‌های افزایش بیان‌یافته، بیشترین امتیاز را در قسمت‌های Voltage-gated Calcium Channel Complex و Calcium Channel Complex به خود اختصاص دادند (جدول مکمل ۵) و بیشترین امتیاز در گروه ژن‌های کاهش بیان‌یافته در قسمت Intracellular Sperm Flagellum و Sperm Flagellum گزارش شد (جدول مکمل ۶).

**آنالیز OMIM disease:** در این مطالعه نتایج بررسی نقش دو دسته ژن نمونه‌ی‌تیمار در بیماری‌های گزارش‌شده نشان داد بیشترین امتیاز نقش ژن‌های افزایش بیان‌یافته در بیماری‌های میگرن، آلزایمر و فشار خون بوده و ژن‌های کاهش بیان‌یافته در هیچ بیماری دیگری گزارش نشده است (جدول شماره ۱).

## آنالیز و کشیدن شبکه پروتئینی (Protein Network):

شبکه ژن‌های افتراقی با نرم‌افزار

(Cytoscape 3.1.1 Plugin GeneMania) کشیده شد (۱۶) پروتئین‌هایی که با فاکتورهای رونویسی استخراج‌شده ارتباطی داشتند به‌وسیله برنامه Genes2 Networks بررسی و استخراج شدند. سپس پروتئین‌های حدواسط به همراه پروتئین‌کینازها و فاکتورهای رونویسی به‌دست‌آمده با برنامه yEd (Version 3.10.2)، شبکه پروتئینی آنها کشیده شد (۱۷، ۱۵).

## آنالیز دارو درمانی:

داروهایی که بر روی ژن‌های دارای بیان افتراقی، تأثیر بیانی داشتند به‌وسیله پایگاه (Connectivity Map) CMAP استخراج شدند (۱۸).

## آنالیز microRNA درمانی:

بررسی microRNA‌هایی که بر روی ژن‌ها و شبکه پروتئینی اثر مهاری داشتند از پایگاه داده MSigDB (Molecular Signatures Database) استخراج و به‌وسیله نرم‌افزار Gene Mania کشیده شدند (۱۶).

## یافته‌ها

### آنالیز داده‌های میکروآری:

پس از آنالیز کتابخانه میکروآری، نتایج آنالیز به‌صورت دو گروه ژن‌های افزایش بیان‌یافته و گروه ژن‌های کاهش بیان‌یافته استخراج شد که تعداد ژن‌های افزایش بیان‌یافته، ۶۲ عدد (جدول مکمل ۱) و تعداد ژن‌های کاهش بیان‌یافته، ۴۸ عدد گزارش گردید (جدول مکمل ۲).

جدول شماره ۱: بررسی ژن‌های افزایش بیان‌یافته در بیماری‌ها

نام بیماری	Combined Score
میگرن	۲/۶۰۹۰۷۹
بیماری آلزایمر	۲/۳۴۷۲۶۴
افزایش فشار خون	۱/۸۲۹۶۱۶
Spastic paraplegia	۱/۳۴۵۰۶۲
آتاکسی نخاعی-مخچه‌ای (Spinocerebellar ataxia)	۱/۳۱۹۵۶۲
بیماری عضله (Myopathy)	۱/۰۱۶۴۵۴

بررسی بیماری‌هایی که ژن‌های افتراقی در آنها نقش بازی می‌کنند به‌صورت جدول فوق گزارش شده است که بررسی‌ها، هیچ نوع بیماری در ژن‌های کاهش بیان‌یافته ارائه نکرد؛ درحالی‌که در دسته ژن‌های افزایش بیان‌یافته، ۶ بیماری یافت شده که به ترتیب بیماری میگرن، آلزایمر و بیماری فشار خون بهترین امتیاز را کسب کردند، همچنین امتیاز Combined Score براساس مجموع امتیازات pvalue, z-score, Adjusted pvalue می‌باشد.

همچنین در پایگاه‌های TF-LOF Expression from GEO و ChEA به ترتیب ۲۸ و ۲۹ TFs (Transcription Factors) بود که ۱۰ TF به‌عنوان برتر پایگاه ChEA گزارش شد. ۲ فاکتور رونویسی SUZ12 و SP1 نیز به ترتیب در ۳ و ۲ دیتابیس بودند (جدول شماره ۲).

**آنالیز فاکتورهای رونویسی:** آنالیز پروموتورهای ژن‌های افزایش بیان‌یافته به جهت یافتن فاکتورهای رونویسی بر روی ۴ دیتابیس انجام گرفت که در پایگاه‌های ENCODE TF ChIP-seq 2015، تنها فاکتور رونویسی SUZ12 و در پایگاه Transcription Factor PPIs فاکتورهای رونویسی SP1 و KDM5B گزارش شدند.

جدول شماره ۲: فاکتورهای رونویسی ژن‌هایی که افزایش بیان یافته‌اند.

فاکتورهای رونویسی	Combined Score
PRDM5	۱۰/۸۱۲۳۳۷۳
IRF1	۸/۶۳۸۱۵۶۰۲۵
E2F1	۸/۰۰۰۸۰۱۷۴۲
NFIB	۷/۶۲۶۳۵۲۵۴۴
SALL4	۷/۱۴۰۱۴۸۲۳۶
TFAP2A	۶/۹۸۷۶۷۷۵۱۷
DNAJC2	۶/۶۹۱۳۰۶۵۲۵
BMI1	۶/۶۱۰۱۳۰۳۷۳
JARID2	۶/۵۷۷۱۷۸۴۱۲
EZH2	۶/۱۴۶۰۵۸۰۰۱

فاکتورهای رونویسی که بیشترین اتصال را با ژن‌های افزایش بیان یافته داشته‌اند، نشان داده شده است.

امتیاز Combined Score براساس مجموع امتیازات  $p$  value,  $z$ -score, Adjusted  $p$  value می‌باشد که به ترتیب فاکتور رونویسی PRDM5 با بیشترین Combined Score در اولویت قرار دارد؛ این بدین معناست که بیشترین تعداد ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

کینازهای PAK3 با ۳/۷، بیشترین امتیاز (Combined score) را نشان دادند (جدول شماره ۳).

در جدول شماره ۳، بررسی پروتئین کینازها از روی پروتئین‌های حد واسط ژن‌های افزایش بیان‌یافته انجام شد. ستون اول، نشان‌دهنده اسم پروتئین کیناز و ستون دوم، بیانگر امتیاز  $p$ -value بوده که ( $p \leq 0/05$ ) معنی‌دار است. همچنین ستون سوم، امتیاز Adjusted  $p$  value بوده که ( $\text{Adjusted } p \text{ value} \leq 0/05$ ) به‌صورت معنی‌دار می‌باشد و ستون چهارم، نشان‌دهنده  $z$ -score بوده که هر قدر منفی‌تر باشد، معنی‌دارتر است. در نهایت، ستون پنجم، بیانگر ترکیب امتیازات

( $p$  value,  $z$ -score, Adjusted  $p$  value) می‌باشد که در Combined score محاسبه و از ترکیب سه امتیاز قبلی، گزارش شده که دقت کار را بالا می‌برد. در این مطالعه پروتئین کیناز PAK3، بیشترین امتیاز را به خود اختصاص داده است.

بررسی پروموتورهای ژن‌های کاهش بیان‌یافته به جهت یافتن فاکتورهای رونویسی مهم همانند ژن‌های افزایش بیان‌یافته در ۴ دیتابیس مطالعه شد که از دیتابیس ChEA، ۲۴۷ فاکتور رونویسی و از دیتابیس ENCODE-ChIP-Seq، ۷۰۹ فاکتور رونویسی و از دیتابیس GEO، ۱۴۰ فاکتور رونویسی و از دیتابیس PPIs، ۲۸ فاکتور رونویسی استخراج شد. پس از مقایسه فاکتورهای رونویسی در هر ۴ دیتابیس، ۳۸ فاکتور رونویسی در ۲ دیتابیس گزارش گردید (جدول مکمل ۷). ۹ فاکتور رونویسی EP300، FOXA2، RNF2، SUZ12، TRIM28، BMI1، SRF، STAT3، MYC در ۳ دیتابیس گزارش شد و تنها فاکتور رونویسی MYC در هر ۴ دیتابیس فاکتور رونویسی متصل‌شده بر روی نواحی بالادستی و پروموتوری ژن‌های کاهش بیان‌یافته گزارش گردید.

**آنالیز پروتئین کینازها:** بررسی پروتئین کینازهای ژن‌های افزایش بیان‌یافته از روی پروتئین‌های حد واسط، آنالیز و استخراج شد که چهار تای اول، امتیاز معنی‌داری داشتند.

جدول شماره ۳: بررسی پروتئین‌های کینازها از روی پروتئین‌های حد واسطه‌ی ژن‌های افزایش بیان یافته

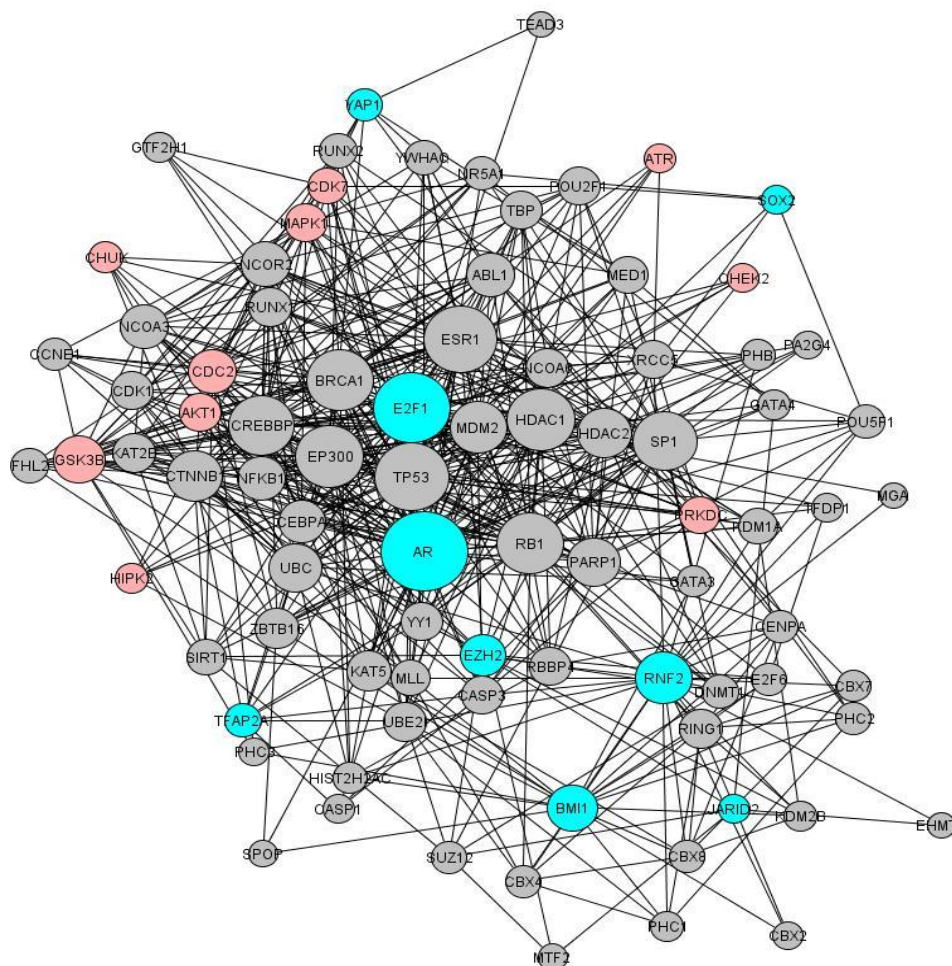
Protein	pvalue	Adjusted pvalue	Z-score	Combined Score
PAK3	۰/۰۲۲۹۴۳۶	۰/۰۹۳۳۶۸۶۷۳	-۱/۵۹۰۰۰۹	۳/۷۷۰۲۲۷۹۰۵
EPHB2	۰/۰۱۲۸۰۳۹	۰/۰۹۳۳۶۸۶۷۳	-۱/۲۸۸۷۲۶	۳/۰۵۵۸۲۵۸۵۹
TYK2	۰/۰۲۵۴۶۴۲	۰/۰۹۳۳۶۸۶۷۳	-۱/۱۲۷۳۵۳	۲/۶۷۳۱۷۸۳۰۲

حدواسطه و پروتئین کینازهای به‌دست‌آمده از ژن‌های افزایش بیان یافته کشیده شد و در آن ۸۶ پروتئین قرار گرفت که سهم پروتئین‌های حد واسطه، ۶۶ پروتئین بود. همچنین شبکه پروتئین کشیده‌شده با داشتن ۵۷۵ ارتباط درون شبکه‌ای، مهم‌ترین پروتئین از لحاظ تعداد ارتباط درون شبکه‌ای؛ پروتئین (AR) Androgen Receptor با ۳۵ ارتباط مستقیم و ۵۰ ارتباط غیرمستقیم که در مجموع ۸۵ ارتباط درون شبکه‌ای گزارش شد (شکل شماره ۱).

در این مطالعه کینازهای دخیل در ژن‌های کاهش بیان یافته از روی پروتئین‌های حد واسطه بررسی شد. بهترین امتیاز به پروتئین کینازهای IRAK1 و IRAK2، IRAK3 به ترتیب با ۲/۹، ۲/۸ و ۲/۷، بیشترین امتیاز (Combined score) را نشان دادند (جدول مکمل ۸). ۱۷ کیناز در این بررسی یافت شد که از بین آنها، تنها ۱۰ عدد معنی‌دار گزارش شد (جدول مکمل ۸).

### آنالیز و کشیدن شبکه پروتئینی (Protein Network):

شبکه پروتئینی متشکل از فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های



شکل شماره ۱: شبکه پروتئینی ژن‌های افزایش بیان یافته نمونه تیمار با ۸۶ پروتئین و ۵۷۵ ارتباط پروتئینی کشیده شد که فاکتورهای رونویسی با رنگ و کینازها با رنگ سبز و پروتئین‌های حدواسطه با رنگ خاکستری روشن کشیده شده است. این شبکه شامل ۸۶ پروتئین بوده که سهم فاکتورهای رونویسی، ۱۰ عدد و کینازها نیز ۱۰ عدد می‌باشد. یافته‌های این مطالعه، ۶۶ عدد پروتئین حد واسطه را نشان می‌دهد که حد واسطه کینازها و فاکتورهای رونویسی قرار دارند. بیشترین ارتباط با ۳۵ ارتباط مستقیم و ۵۰ ارتباط غیرمستقیم در مجموع با ۸۵ ارتباط به فاکتور رونویسی (AR) Androgen Receptor نشان داده شده‌اند. حجم دایره‌ها مربوط به میزان ارتباط با شبکه است و هر چه حجم کمتر باشد، ارتباط کمتر و هر چه حجم بیشتر باشد، ارتباط بیشتر است.





جدول شماره ۴: داروهای مؤثر بر ژن‌های افتراقی

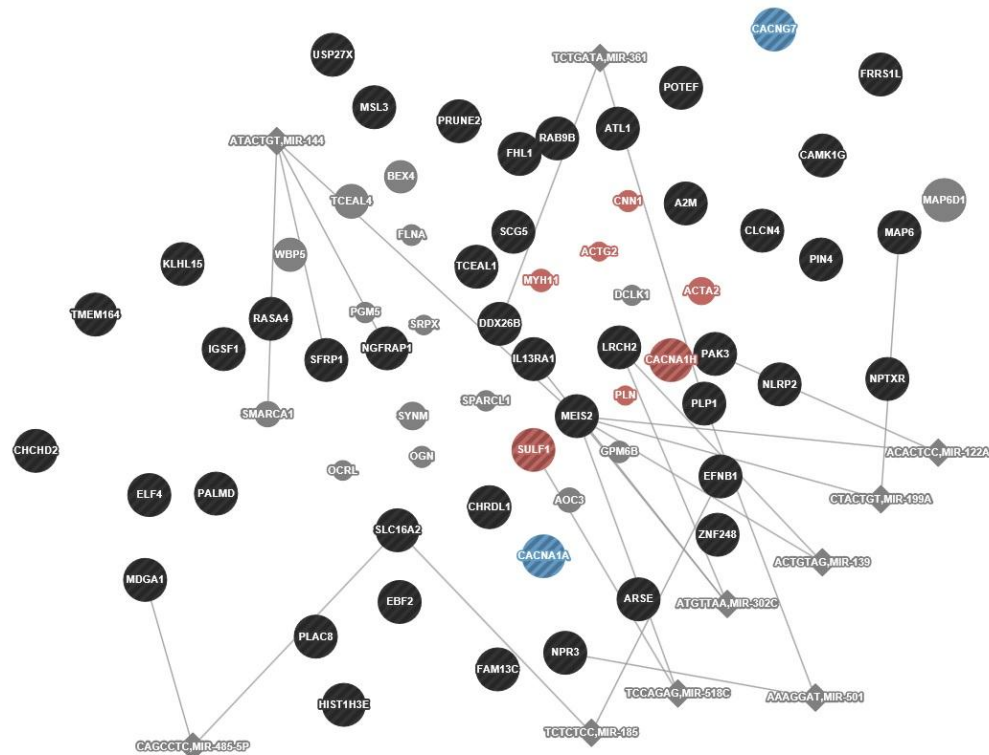
Drugs Revers URGs	Drugs Induce DRGs
15-delta prostaglandin J2-1011	benfluorex-5327
hydrocortisone-6684	valinomycin-5957
perphenazine-4637	loperamide-1533
cyproheptadine-6740	MG-132-1140
kanamycin-4625	STOCK1N-28457-6869
furazolidone-4098	monensin-4726
fludrocortisone-3785	gossypol-2202
benzocaine-4224	pyrvinium-6339
prasterone-6474	abamectin-7218
fusaric acid-3986	oxedrine-6156

داروهایی که بر روی ژن‌های افتراقی اثر مهاری (Drugs Revers Up Regulated Genes) URGs و یا القا می‌کنند (Drugs Induce Down Regulated Genes) DRGs

داروهایی است که بر روی ژن‌های افزایش بیان یافته در بیماری فشار خون شریانی اثر مهاری داشته‌اند. همچنین در ستون دوم، لیست داروهایی قرار دارد که روی ژن‌های کاهش بیان یافته اثر القا می‌دارند. اعداد بعد از خط تیره، نشانگر میزان دوز و زمان استفاده دارو در پایگاه CMAP می‌باشد.

MEIS2، SFRP1 و NGFRAP1، بیشترین امتیاز را در مهار شبکه کسب کرد. همچنین *miR-518c* با مهار SULF1 که در سیستم ماهیچه‌ای و انقباض ماهیچه‌ها عملکرد دارد، می‌تواند مهم در نظر گرفته شود. در ضمن، مهارگر پروتئین اصلی شبکه (PLP1) در شکل *miR-501* نمایش داده شد که می‌تواند از بابت مهار شبکه، مهم تلقی گردد (شکل شماره ۳).

**آنالیز microRNA درمانی:** نتایج پیش‌بینی microRNAهایی که روی ژن‌های افزایش بیان یافته در فشار خون شریانی نقش مهاری داشتند بدین ترتیب گزارش شد که بیشترین امتیاز به microRNAهای *miR-144*، *miR-122A* و *miR-361* همچنین *miR-302c* اختصاص یافت (شکل شماره ۳). از این بین *miR-144* با مهار ۲/۴۸٪ شبکه؛ یعنی ۴ پروتئین SMARCA1،



شکل شماره ۳: microRNAهای مهارگر شبکه ژنی و نحوه مهار شبکه *miR-144*

مهم‌ترین مهارگر شبکه معرفی شده است.

## بحث

بیماری فشارخون شریانی ریوی، در رگ‌های نازک ریوی ایجاد شده و از علائم آن تنگی عروق و فشار خون بالا می‌باشد (۵). در این بیماری جداره رگ‌ها تنگ شده و ممکن است مسدود شود. در ایجاد PAH، عوامل مختلف مولکولی، نقش ایفا می‌کنند (۵)، که برای ایجاد آن یکی از این عوامل کافی است و این نکته باعث شده این بیماری، نقطه آغاز مشخصی نداشته باشد (۱۹) تا یکی از مجهولات PAH همچنان باقی بماند. پروستاسایکلین (از محصولات آراشیدونیک اسید از پروستاگلاندین) در لایه درون رگی تولید می‌شود (۲۰) و به دلیل افزایش حالت آرامش در عروق خونی (۲۱) و کاهش قابل توجه فعالیت پلاکت‌ها (۲۲)، به‌عنوان یکی از درمان‌های بیماری در نظر گرفته شده و اولین بار نیز در سال ۱۹۸۴ توسط Higenbottam، به‌عنوان درمان مورد استفاده قرار گرفت (۲۳). تاکنون برای درمان طولانی مدت این بیماری جوابی یافت نشده است، همچنین از اشکالات استفاده از پروستاسایکلین می‌توان به هزینه بالای آن و عوارض زیاد مانند سردردها و دردهای ناحیه فک، پا، اسهال و تهوع اشاره کرد که عمده این عوارض از میزان دوز دارو و مدت زمان مصرف دارو می‌باشد (۲۷-۲۴). با توجه به توضیحات بالا، نیاز به درمان جدید در بیماری فشارخون شریانی ریوی احساس شده و به‌همین جهت در این مطالعه، فاکتورهایی جهت تشخیص سریع‌تر بیماری، همچنین درمان‌های دارویی جدید و درمان‌های مولکولی بررسی گردید و برای یافتن راه‌های مناسب تشخیصی و درمانی که نیاز به شناخت بهتر سیستم اجزای مؤثر در بیماری دارد، از تکنیک‌های سیستم بیولوژی استفاده شد (۱۱). در مطالعه حاضر پروتئین‌هایی جهت تشخیص سریع‌تر بیماری و داروهای مولکولی و شیمیایی جهت درمان کاندید شدند. در مقایسه کتابخانه میکروآرایی بین گروه نرمال (سال) و گروه تیمار به فشارخون شریانی ریوی، ۶۲ ژن افزایش و ۴۸ ژن کاهش بیان‌یافته مشخص گردید. بیشترین ژنی که افزایش بیان داشت، ژن *Coiled-coil-helix-coiled-coil-2* (CHCHD2) *helix domain containing 2* بود (جدول مکمل ۱)، درحالی‌که بیشترین ژنی که کاهش بیان داشت، ژن *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, Y-linked* (DDX3Y) گزارش شد (جدول مکمل ۲).

ژن‌های افتراقی جهت بررسی عملکردی آنالیز شدند که نتایج بررسی ژن‌های افزایش بیان‌یافته در عملکرد کانال‌های کلسیمی گزارش گردید (جدول مکمل ۳). کانال‌های کلسیمی به‌نوعی کنترل‌کننده حالت‌های استراحت و فعال سلول‌های ماهیچه بوده که باعث انقباض و انبساط عضله می‌شوند. با توجه به اینکه یکی از علائم بیماری فشارخون شریانی ریوی؛ انقباض عضلات و بالابودن فشار در عروق گزارش شده است، لذا دلیل این انقباضات را می‌توان افزایش بیان ژن‌های جدول مکمل ۱ دانست. درحالی‌که ژن‌های کاهش بیان‌یافته، عملکردشان در *Histone demethylase* و *Demethylase* و *RNA polymerase II* *regulatory region DNA binding* گزارش شده که نشان می‌دهد ژن‌های کاهش بیان‌یافته در برداشتن متیل‌ها از روی پروتئین‌های هیستون مؤثرند و این عملکرد در بازکردن هیستون‌ها از هم و اجازه ورود *RNA Pol* برای رونویسی نقش دارد و سپس ژن مورد نظر با مکانیسم رونویسی بیان می‌شود. عوامل بیماری فشار شریانی خون ریوی با مهار ژن‌های کاهش بیان‌یافته مانع از بازشدن هیستون‌ها و در ادامه، مانع بیان ژن‌های مدنظر خواهند شد. همچنین با مهار ژن‌هایی که عملکرد تنظیم رونویسی را به عهده دارند با اتصال به مناطقی از *DNA* باعث کنترل *RNA pol II* می‌شوند که نتیجه این عملکرد کاهش میزان رونویسی در سلول‌های آسیب‌دیده است. در مطالعه حاضر، نقش ژن‌های مورد مطالعه در بیماری‌ها بررسی گردید و ژن‌های کاهش بیان‌یافته در بیماری دیگری یافت نشد، اما ژن‌های افزایش بیان‌یافته، در بیماری‌های دیگری نظیر میگرن، آلزایمر و فشارخون نیز گزارش گردید که نشان‌دهنده ارتباط این سه بیماری با هم بود که ممکن است در آینده فرد مبتلا به فشارخون؛ مستعد ابتلا به آسیب‌های مغزی نظیر آلزایمر و میگرن نیز باشد (جدول شماره ۱).

در مطالعه حاضر نواحی بالادستی و پروموتوری ژن‌های افتراقی جهت استخراج فاکتورهای رونویسی بررسی شد. فاکتورهای رونویسی به‌دست‌آمده از دیتابیس ChEA، ملاک قرار گرفت و داده‌ها از دیتاهای *Chip-chip* و *Chip-Seq* با ۳ دیتابیس دیگر مقایسه شدند که ۱۰ فاکتور رونویسی برتر دیتابیس ChEA گزارش گردید (جدول شماره ۲). از بین ۴ دیتابیس فاکتورهای رونویسی، *SUZ12* و *SP1* بیشترین تکرار را با ۳ و ۲ تکرار



پیش‌بینی داروهایی که بر روی ژن‌های افزایش بیان یافته اثر مهاری داشته‌اند در داروهای پروستاگلاندین (PGJ<sub>2</sub>) 15-delta prostaglandin J2 [via 0.00001 (M) dosage per 6 hour] و Hydrocortisone [via 0.000011 (M) dosage per 6 hour] بود که از نمونه مشابه PGI<sub>2</sub> از سال ۱۹۸۴ تا به امروز به‌عنوان درمان استفاده شده است. در این مطالعه نیز نمونه دیگر پروستاگلاندین؛ یعنی PGJ<sub>2</sub> با دوز مشخص (0.00001 M) و مدت ۶ ساعت یک‌بار، به‌عنوان کاندید درمان معرفی گردید. همچنین داروهایی که در القای ژن‌های کاهش بیان یافته نقش داشتند نشان داده شد. هر دو دسته دارو جهت درمان بیماری فشار خون شریانی ریوی، کاندید این مطالعه بودند (جدول شماره ۴). نتایج پیش‌بینی‌های انجام‌شده برای مهار ژن‌های افزایش بیان یافته با درمان‌های مولکولی نشان داد *miR-144* با مهار ۲/۴۸٪ شبکه ژنی (شکل شماره ۳)، بیشترین امتیاز را به خود اختصاص داده است، همچنین *miR-501* با مهار پروتئین اصلی شبکه PLP1 می‌تواند اثرگذار باشد. در این مطالعه هر دو microRNA به‌عنوان کاندیدهای درمان مولکولی گزارش شدند (شکل شماره ۳).

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر پروتئین کیناز PAK3 جهت تشخیص سریع بیماری فشار خون ریوی گزارش شد. همچنین جهت درمان بیماری فشار خون ریوی القای فاکتور رونویسی MYC و استفاده از داروهای پروستاگلاندین جی ۲ (PGJ<sub>2</sub>) با دوز ۰/۰۰۰۰۱ مولار با مدت زمان هر ۶ ساعت یک‌بار و استفاده از microRNAهای *miR-144* و *miR-501* پیش‌بینی و به‌عنوان کاندید درمان گزارش شدند.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی جهت حمایت مالی این پروژه کمال تشکر را داریم.

به ترتیب داشتند که می‌توانند در تشخیص بهتر بیماری هدف خوبی باشند. همچنین آنالیز TF بر روی ژن‌های کاهش بیان یافته نیز انجام شد که فاکتورهای رونویسی دخیل در ژن‌های کاهش بیان یافته در ۴ دیتابیس مقایسه گردید که MYC به‌عنوان تنها TF، در تمام دیتابیس‌ها به‌طور معنی‌دار گزارش گردید. بنابراین، MYC فاکتور مهمی است برای ژن‌های کاهش بیان یافته از جهت تشخیص و حتی درمان، همچنین فاکتورهای رونویسی دیگری همچون TF 9 که در ۳ دیتابیس گزارش شدند، حتی TF 38 که در ۲ دیتابیس به‌طور معنی‌دار بود (جدول مکمل ۷)، همه به‌عنوان هدف‌های تشخیصی و درمانی انتخاب شدند.

پروتئین کینازها، فعال‌گرهای مولکولی هستند که توسط فسفاتاز کردن، پروتئین را فعال می‌کنند به‌همین دلیل در مطالعه حاضر آنالیز یافتن آنها از روی پروتئین‌های حد واسط انجام گرفت که بهترین پروتئین کیناز یافت‌شده از ژن‌های افزایش بیان یافته، PAK3 گزارش گردید (جدول شماره ۴)، درحالی‌که در ژن‌های کاهش بیان یافته، IRAK3 اعلام شد (جدول مکمل ۸). همچنین در این مطالعه به جهت شناخت بیشتر مسیر دقیق و ارتباط همه مؤلفه‌های پروتئینی دخیل در فشار خون شریانی ریوی، شبکه‌ای از پروتئین‌های مهم پیش‌بینی‌شده کشیده شد. شبکه پروتئینی کشیده‌شده از اطلاعات سه دسته شامل: فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های حد واسط و پروتئین کینازها به دست آمد که نتایج پروتئین‌های مهم ژن‌های افزایش بیان یافته در شکل شماره ۱ نمایش داده شده است. در شکل شماره ۱ بیشترین ارتباط با ۳۵ ارتباط مستقیم و ۵۰ ارتباط غیرمستقیم به فاکتور رونویسی AR (Androgen Receptor) نشان داده شده که بیانگر اهمیت فاکتور رونویسی AR می‌باشد. شبکه پروتئین کشیده‌شده نیز می‌تواند در جهت شناخت بیشتر عوامل و مکانیسم‌های دخیل در ایجاد بیماری فشار خون شریانی ریوی مورد استفاده قرار گیرد. شبکه ژنی ژن‌های افزایش بیان یافته نیز کشیده شد (شکل شماره ۲). شبکه ژنی دارای ۴۷ ژن از ۶۲ ژن افزایش بیان یافته است و ۲۰ پروتئین حد واسط ژن‌های افزایش بیان یافته پیش‌بینی گردید و مهم‌ترین پروتئین شبکه پروتئین PLP1 با دارا بودن ۲۴ ارتباط گزارش شد که هدف مناسبی برای درمان و تشخیص بیماری می‌تواند باشد (شکل شماره ۲).

## References:

1. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.
2. Raiesdana A, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *Ann Med* 2006;38(2):95-110.
3. Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(16):1527-38.
4. McLaughlin VV, Davis M, Cornwell W. Pulmonary arterial hypertension. *Curr Probl Cardiol* 2011;36(12):461-517.
5. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;351(16):1655-65.
6. Murali S. Pulmonary arterial hypertension. *Curr Opin Crit Care* 2006;12(3):228-34.
7. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, et al. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2003;111(9):1339-46.
8. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2001;108(8):1141-50.
9. Marcos E, Fadel E, Sanchez O, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, et al. Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004;94(9):1263-70.
10. Kitano H. Systems biology: A brief overview. *Science* 2002;295(5560):1662-4.
11. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 2013;41(Database issue):D991-5.
12. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013;14:128.
13. Goi C, Little P, Xie C. Cell-type and transcription factor specific enrichment of transcriptional cofactor motifs in ENCODE ChIP-seq data. *BMC Genomics* 2013;14 Suppl 5:S2.
14. Chen EY, Xu H, Gordonov S, Lim MP, Perkins MH, Ma'ayan A, et al. Expression 2Kinases: mRNA profiling linked to multiple upstream regulatory layers. *Bioinformatics* 2012;28(1):105-11.
15. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Bader GD, Morris Q. GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. *F1000Res* 2014;3:153.
16. Berger SI, Posner JM, Ma'ayan A. Genes2Networks: Connecting lists of gene symbols using mammalian protein interactions databases. *BMC Bioinformatics* 2007;8:372.
17. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 2006;313(5795):1929-35.
18. Highland KB. Pulmonary arterial hypertension. *Am J Med Sci* 2008;335(1):40-5.
19. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976;263(5579):663-5.
20. Ipp LH, Finney P, Turcato S, Tran S, Rubin LJ, Tinker A. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(2):194-201.

21. Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB, et al, Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med* 1990;112(7):485-91.
22. Higenbottam T, Wheeldon D, Wells F, Wallwork J. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin). *Lancet* 1984;1(8385):1046-7.
23. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1996;334(5):296-301.
24. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: The impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 2002;106(12):1477-82.
25. Sitbon O, Humbert M, Nunes H, Parent F, Garcia G, Hervé P, et al, Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: Prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(4):780-8.
26. Sitbon O, Humbert M, Simonneau G. Primary pulmonary hypertension: Current therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;45(2):115-28.

## Prediction of New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Pulmonary Arterial Hypertension by Systems Biology Methods

Ali Salari<sup>1\*</sup>, Fatemeh Salarian<sup>2</sup>

### Abstract

**Background and Objectives:** The pulmonary arterial hypertension is a narrow vessel disease, which is associated with hypertension and arterial stenosis and, finally, disorder of the right ventricle. This study was conducted with the purpose of finding new diagnostic and therapeutic approaches in pulmonary arterial hypertension using different systems biology and bioinformatics methods.

**Methods:** In this study, microarray data of two groups (normal group as the control and pulmonary arterial hypertension as the treatment group), were compared using GEO2R software. Also, Protein kinase analysis, transcription factor analysis, protein-protein interactions, microRNA, and pharmaceutical analyzes, were performed on two sets of differential genes using KEA, ChEA, Genes2 Networks, Target Scan microRNAs, and Connectivity Map (CMap) databases. software respectively. Finally, the protein network of differential genes of pulmonary arterial hypertension was mapped using the obtained data.

**Results:** SUZ12 and SP1 transcription factors and MYC transcription factor were, respectively, predicted and reported as the important transcription factors of up-regulated and down-regulated genes. Moreover, PAK3 and IRAK3 were reported as the kinases of up-regulated genes and down-regulated genes, respectively, and PAK3 as a rapid diagnosis and therapeutic candidate. Briefly, Prostaglandin J<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>) at a dose of 0.00001 M every 6 hours, and microRNAs *miR-144* and *miR-501* were predicted as suppressor of up-regulated genes of pulmonary arterial hypertension and reported as a therapeutic candidate.

**Conclusion:** Application of systems biology methods could show a path towards diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension using PAK3 marker, *miR-144*, and *miR-501*, and Prostaglandin J<sub>2</sub> drug.

**Keywords:** Pulmonary arterial hypertension; Protein interaction maps; Drug therapy, MicroRNAs therapy; Systems biology tools.

<sup>1</sup>Young Researchers & Elite Club, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

<sup>2</sup>Faculty of Basic Science, Payame Noor University, Qom, Iran.

\*Corresponding Author:  
Ali Salari, Young Researchers & Elite Club, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

Email:  
asalari1365@gmail.com.

Received: 20 Sep, 2015

Accepted: 18 Oct, 2015