

A comparative proteomic study of chondral chondrocytes in osteoarthritis patients with normal chondrocytes

Zamani B^{1*}, Khosravi Gh², Rezaei-Tavirani M³, Hashemi-Takhonche M⁴, Heidari-Keshel S³

1- Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Department of Orthopedic, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

3- Proteomics Research Center, Shahid Behesht University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

4- Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received October 2, 2013; Accepted Jan 11, 2014

Abstract:

Background: Osteoarthritis (OA) is a common degenerative disease of joints and the main cause of elder patients' disability. Cartilage damage is a major problem in OA. To investigate the pathogenesis of OA, this study aimed to analyze the differential proteomics of chondrocytes in OA patients compared to normal chondrocytes.

Materials and Methods: Protein extracts of cartilages prepared from 7 patients with end-stage OA, who were candidates for arthroplasty, were compared to 7 samples from normal cartilages. Proteins were analyzed by fluorescent gel electrophoresis (2D-DIGE) method and the differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry (MS). Two samples were lost because of tissue insufficiency and the other because of mistransportation.

Results: Among the 25 analyzed proteins, difference was seen for the 8 following proteins: osteonectine, cathepsin, chondroadherin, HSP, clustrine and collagen II, Activin A and carbonic Anhydrase. The levels of osteonectine, cathepsin, clustrine and collagen II were decreased in the OA samples compared to normal chondrocytes. Moreover, the levels of chondroadherin and Activin A were increased in the OA samples compared to normal chondrocytes.

Conclusion: The findings demonstrate the ability of the 2D-DIGE/MS platform to identify proteins with altered expression in chondrocytes of patients with OA. The identification of these proteins may open new lines of research for the pathogenesis of OA.

Keywords: Osteoarthritis, Proteome, Cartilage, Chondrocyte, 2D-DIGE

* Corresponding Author.

Email: Batol_zamani2007@yahoo.com

Tel: 0098 361 555 0026

Fax: 0098 361 555 8900

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences June, 2014; Vol. 18, No 2, Pages 159-166

Please cite this article as: Zamani B, Khosravi Gh, Rezaei-Tavirani M, Hashemi-Takhonche M, Heidari-Keshel S. A comparative proteomic study of chondral chondrocytes in osteoarthritis patients with normal chondrocytes. *Feyz* 2014; 18(2): 159-66.

مقایسه پروتئومیکس کندروسیت غضروف بیماران مبتلا به استئوآرتریت با غضروف طبیعی

بتول زمانی^{۱*}، غلامرضا خسروی^۲، مصطفی رضائی طاویرانی^۳، مرضیه هاشمی طاخونچه^۴، سعید حیدری کشل^۵

خلاصه:

سابقه و هدف: استئوآرتریت (OA) شایع‌ترین بیماری دژنراتیو مفصلی و مهم‌ترین علت ناتوانی بیماران مسن می‌باشد. آسیب غضروف یک مشکل عمده در بیماری استئوآرتریت است. در این مطالعه به منظور فهم پاتوژنز استئوآرتریت به بررسی پروتئوم کندروسیت غضروف بیماران مبتلا به استئوآرتریت در مقایسه با غضروف نرمال پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پروتئین‌های غضروف ۷ بیمار مبتلا به استئوآرتریت در مرحله نهائی، که اندیکاسیون آرتروپلاستی داشتند با ۷ نمونه غضروف سالم مقایسه شده و پروتئین‌ها با روش ژل الکتروفورز دو بعدی فلورسانت (2D-DIGE) آنالیز شدند. افتراق بین پروتئین‌های استخراج شده توسط pH ایزوالکتریک و وزن مولکولی تعیین شده و برای آنالیز از نرم‌افزار Progenesis same spot استفاده شده است.

نتایج: در این مطالعه از بین ۲۵ پروتئین آنالیز شده تعداد ۸ پروتئین شامل پروتئین‌های استونکتین، کلاستین، کاتپسین، کلاژن تیپ ۲، کندروادهین، کربنیک انهدراز، اکتیوین A و Heat shock protein (HSP) بین دو نمونه اختلاف داشتند که تغییرات آنها به صورت زیر می‌باشد: سطح پروتئین‌های استونکتین، کلاستین، کاتپسین و کلاژن تیپ ۲ در نمونه‌های مبتلا به استئوآرتریت نسبت به نمونه‌های سالم کاهش یافته و سطح پلی‌پپتید کندروادهین و اکتین A در نمونه‌های مبتلا به استئوآرتریت افزایش بارزی داشت.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت روش 2D-DIGE و MS توانایی نشان دادن تغییر در بروز پروتئین‌ها در غضروف مبتلایان به استئوآرتریت را دارد و مشخص شدن تغییر در پروتئوم راه را برای بررسی‌های بیشتر در مورد پاتوژنز استئوآرتریت فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: استئوآرتریت، پروتئوم، پروتئومیکس، کندروسیت، 2D-DIGE

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۳، صفحات ۱۶۶-۱۵۹

مقدمه

حفظ غضروف توسط سلول‌های اختصاصی کندروسیت است که تقریباً ۲ درصد حجم غضروف را در افراد بالغ شامل می‌شود. ماتریکس غضروف به طور اساسی از کلاژن‌ها (اغلب کلاژن نوع II و به مقدار کمتر از دیگر کلاژن‌ها) پروتئوگلیکان‌ها و آگریکان تشکیل شده است [۵]. تخریب غضروف در OA شامل تخریب در ماکرومولکول‌های ماتریکس و تغییر در بروز پروتئین‌های کندروسیت است [۶]. تغییرات دژنراتیو باعث تولید کلاژن و قطعات پروتئوگلیکان می‌شود که بیومارکرهای بالقوه در خون، مایع سینوویال و ادرار هستند که تشخیص داده می‌شوند [۷]. پروتئومیکس نوعی مطالعه سیستماتیک تمام پروتئین‌هایی است که در یک سلول، بافت و یا موجود زنده بیان می‌شوند. در مقایسه با چهل هزار ژن موجود در ژنوم انسان، بیش از پانصد هزار پروتئین محتوای پروتئینی انسان را تشکیل می‌دهند، که به صورت آزاد در مایعات بیولوژیک، متصل به غشا و یا درون سلول وجود دارند. واژه پروتئومیکس در اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی ابداع شد [۸]. بعداً با پیشرفت‌هایی که در الکتروفورز دو بعدی (2-DE) و ژل الکتروفورز فلورسانت حاصل شد، این علم نیز پیشرفت کرد [۹]. 2D-DIGE نوع پیشرفته 2-DE می‌باشد. در این روش گروه لیزین روی پروتئین‌ها با سیانین ۳ و ۵ فلورسنت نشان‌دار می‌شوند.

استئوآرتریت (OA) شایع‌ترین بیماری دژنراتیو مفصلی و مهم‌ترین علت ناتوانی بیماران مسن می‌باشد. دژنراسیون غضروف مفصل همراه با تغییرات در استخوان زیر غضروف تصویر بارز استئوآرتریت می‌باشد [۲، ۱]. استئوآرتریت از لحاظ اثر بر روی کیفیت زندگی و ناتوانی مزمن مهم‌ترین علت بعد از علل قلبی-عروقی است [۳]. در حدود ۱/۳ بیماران بالای ۳۵ سال استئو-آرتریت را در طول زندگی خود تجربه خواهند کرد [۴]. غضروف نرمال خیلی اختصاصی و سطح صاف و صیقلی دارد. عصب لئف و رگ خونی ندارد.

^۱ دانشیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۲ استادیار، گروه ارتوپدی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۳ استاد، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۴ دستیار، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۵ استادیار، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب روانی، بیمارستان شهید بهشتی

تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۰۰۲۶ | دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۸۹۰۰

پست الکترونیک: Batol_zamani2007@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۰ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۱۰/۲۱

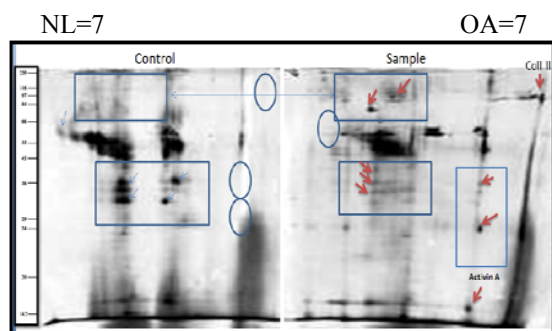
و نمونه بلافاصله درون نیتروژن مایع قرار گرفت تا الگوی پروتئینی آن تغییر نکند. در مرحله بعد با جداسازی کندروسیت‌ها و کشت آن‌ها در محیط کشت، امکان مطالعه فراهم گردید. سپس، وارد مرحله آماده‌سازی نمونه جهت به‌دست آوردن رسوب پروتئینی شدیم. این مرحله به دستگاه‌هایی چون سانتریفیوژ یخچال دار (۴ درجه) جهت جلوگیری از بهم پیوستن پروتئین‌ها در دور بالا و نیز هموژنایزر نیاز داشت. بافت غضروفی تهیه شده از مفاصل سالم و مبتلا در اندازه‌های ۲×۲×۲ میلی‌متر تقسیم شده و به مدت ۴ روز با حدود ۱۲ میلی‌لیتر بافر (حاوی ۴ مول گوانیدین HCL و ۵۰ میلی‌مول سدیم استات) قرار داده شد. مخلوط به‌دست آمده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفت. پس از انجام سانتریفیوژ و تهیه رسوب پروتئینی، غلظت آن را با سنجش برادفورد و به کمک دستگاه UV اسپکتروسکوپی محاسبه کرده و وارد مراحل پروتئومیکس شدیم. هدف از مطالعه یک پروتئوم، معمولاً تفکیک و نمایش محصولات پروتئینی موجود در نمونه است؛ بنابراین به‌منظور دستیابی به حداکثر میزان تفکیک، روش الکتروفورز دوبعدی (۲ DE) ابداع شده است. بعد اول این مرحله IEF (Iso Electric Focusing) نام دارد که از نوارهای ژلی آماده در بازار به نام استریپ استفاده می‌شود که در محدوده‌های مختلف pH موجود است. دستگاه مورد استفاده در مرحله اول IPG نام دارد (Imobilized pH Gradient) و در این مرحله پروتئین‌ها درون دستگاه IPG بسته به pH ایزوالکتریک خود روی نوار استریپ تفکیک شدند. روز سوم بعد دوم الکتروفورز دوبعدی یعنی SDS page پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی تفکیک گردیدند. در این مرحله پس از آماده کردن ژل بر پایه پلی‌اکریل‌امید، نوار استریپ بعد اول را روی ژل درون تانک SDS page قرار داده و ۵ تا ۷ ساعت با ولتاژ ۲۵۰ ولت و جریان ۵۰ میلی‌آمپر الکتروفورز انجام گردید. سپس، ژل مورد نظر را از تانک خارج نموده و به‌روش نترات نقره با حساسیت بالا و کماسی بلو با حساسیت کمتر و دقیق‌تر جهت رویت لکه‌های پروتئینی رنگ-آمیزی شد و بدین ترتیب با رویت لکه‌ها از نظر کیفی به افزایش، کاهش و یا عدم بیان پروتئین‌های مورد نظر روی ژل نسبت به گروه کنترل پی‌بردیم. سپس، لکه‌های مورد نظر جهت تشخیص ماهیت با تکنیک طیف سنجی جرمی آنالیز شدند. در این روش از تکنیک TOF MALDI_ استفاده می‌شود؛ به این ترتیب که با تابش لیزر به لکه‌های مورد نظر سبب یونیزاسیون و حرکت اتم-های آن درون لوله TOF و رسیدن به دکتور، می‌توان به‌طور

سپس، نمونه‌ها روی ژل نوع 2D الکتروفورز می‌شوند که امکان مقایسه کمی مستقیم در یک ژل و امکان مقایسه کمی میزان پروتئین‌های بین ژل‌ها را فراهم می‌کند. پیشرفت‌های اصلی در 2D-DIGE در حساسیت و امکان تکرارپذیری آن و طیف گسترده دینامیک بودن آن است [۱۲-۱۰]. ترکیب روش-2D DIGE با روش matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) یک روش قوی برای تعیین پروتئین‌های مربوط به بیماری‌ها است [۱۳]. با توجه به افزایش شیوع استئوآرتریت، اقدامات چندگانه ضروری و مورد نیاز است؛ از جمله کمپین‌های آموزشی برای پیشگیری از استئوآرتریت و تأمین بودجه تحقیقات برای شناسایی درمانی که علل را به‌جای علائم استئوآرتریت مورد توجه قرار دهند. امروزه، هیچ داروی موثر بر فعالیت این بیماری شناسایی نشده است. بدون شک، کشف بیومارکرها در اوایل تشخیص استئوآرتریت کمک به شناسایی درمان دارویی جدید با هدف توقف استئوآرتریت قبل از آن که غیرقابل برگشت شود، خواهند بود. در عمل بیومارکرها به پزشکان در جهت نظارت بر پیشرفت استئوآرتریت و ارزیابی اثر بخشی درمان با قابلیت اطمینان بیش از انجام تصویربرداری کمک خواهد کرد [۱۴]. اکثریت بیومارکرها پروتئین-ها و متابولیت‌های بیوشیمیایی هستند [۷]. هدف از این مطالعه بررسی پروتئین‌های تغییر یافته در کندروسیت بیماران مبتلا به OA در مراحل انتهایی بیماری با غضروف نرمال می‌باشد. مشخص کردن این پروتئین‌ها می‌تواند در گسترش علم در فرآیند پاتولوژیک آسیب غضروف مفصل و تشخیص و درمان بر اساس پاتولوژی بیماری کمک خواهد کرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه با طراحی مقطعی ۱۰ بیمار با تشخیص استئوآرتریت شدید هیپ و یا زانو با توجه به شواهد کلینیکی و رادیولوژیک (بر اساس معیارهای انجمن روماتولوژیک آمریکا) که کاندید عمل آرتروپلاستی کامل مفصل هیپ یا زانو بودند، انتخاب شدند. در زمان انجام عمل آرتروپلاستی مفصل ۱۰ نمونه از غضروف با استئوآرتریت و ۱۰ نمونه از غضروف همان بیمار که در ظاهر سالم بود، هم‌زمان تهیه شد. قبل از عمل جراحی و نمونه‌گیری رضایت بیماران به‌طور کتبی جلب گردید. بعد از شستشو دادن سطح غضروف با نرمال سالین از چاقوی جراحی برای بریدن یک قطعه موازی به اندازه‌ی ۵ در ۵ میلی‌متر از سطح غضروف و عمق آن تا حدود استخوان زیر غضروف برداشته شده

شکایت داشتند که بیشتر تورم مفصل زانو بوده است. در این مطالعه نقشه پروتئومیکس کندروسیت‌های غضروف سالم و مبتلا به استئوآرتریت مقایسه گردید. در کل در این مطالعه حدود ۲۵ لکه پروتئینی پس از انجام مطالعات بیوانفورماتیک بر روی ژل به‌دست آمد که جهت تسهیل آنالیز نتایج حاصله نمونه‌های هر ۷ ژل با یکدیگر مطابقت داده شد (تصویر شماره ۱) و پروتئین‌هایی که در بیش از ۳ نمونه از بیماران یا افراد سالم بروز داده شده بود، به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در نمونه‌ها گزارش شد. از طرفی در نمونه‌های نرمال و بیمار پروتئین‌هایی که بروز کمتری (کاهش سطح در بیش از ۳ نمونه) و کاهش شدید نشان دادند، به‌عنوان کمترین پروتئین‌های موجود گزارش شدند. پس از مطابقت نقشه پروتئومیکس غضروف‌های مفصلی سالم و مبتلا به استئوآرتریت نتایج ذیل حاصل شد:



تصویر شماره ۱- مقایسه نقشه پروتئومیکس کندروسیت نرمال و مبتلا به استئوآرتریت

دقیق پی به ماهیت پروتئین برد. هم‌چنین، می‌توان با استفاده از نرم افزار قبل از انجام طیف سنجی جرمی، تا حدودی تغییر پروتئوم را تشخیص داد. دقت کار این روش خیلی کمتر از روش طیف سنجی جرمی است، اما با توجه به اینکه روش طیف سنجی جرمی بسیار تکنیک سنگین و پرهزینه‌ای است در این طرح به آنالیز کیفی نتایج با روش samespot اکتفا نموده و ارتباط پروتئین‌ها از طریق آنالیزهای بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه ۱۰ بیمار مبتلا به استئوآرتریت زانو و هیپ شناخته‌شده بر اساس معیارهای انجمن روماتولوژی آمریکا (ACR) که با توجه به شدت استئوآرتریت در رادیوگرافی و معاینه بالینی اندیکاسیون عمل جراحی آرتروپلاستی داشتند، وارد مطالعه شدند. از این تعداد بیمار، ۲۰ نمونه (۱۰ نمونه از قسمت غضروف با ظاهر ماکروسکوپی سالم و ۱۰ نمونه از قسمت غضروف با ظاهر ماکروسکوپی مبتلا به استئوآرتریت) جهت بررسی‌های پروتئومیکس در حین عمل جراحی گرفته شد. تعداد ۲ نمونه به‌علت ناکافی بودن میزان بافت و یک نمونه به‌علت اشکال در انتقال از مطالعه حذف شدند. از ۷ نمونه بافت بیماران مورد مطالعه، ۵ نفر زن (۷۱ درصد) و ۲ نفر مرد (۲۹ درصد) بودند. میانگین سنی بیماران ۶۴/۷ سال و میانگین طول مدت بیماری آنها ۶/۲۸ سال بود. درگیری مفصل زانو در ۴ بیمار و درگیری مفصل هیپ در ۳ بیمار وجود داشت. شکایت اصلی تمام بیماران (۱۰۰ درصد) درد بوده و حدود ۴۲ درصد بیماران (۳ نفر) از تورم مفصل

جدول شماره ۱- بیومارکرها پروتئینی در افراد نرمال در مقایسه با مبتلایان به استئوآرتریت

	Up-Regulated	Down-Regulated	Present	Absent
Sample	Chondroadherin	Osteonectin	Coll II	Carbonic anhydrase
		Clustrin	Heat shock protein	
		Cathepsin	Chondroadherin	
		Coll II	Active A	
Control	Osteonectin	Active A	Carbonic anhydrase	Coll II
	Clustrin			Chondroadherin
	Cathepsin			

در این مطالعه از بین ۲۵ پروتئین که بر اساس وزن مولکولی و pH ایزوالکتریک آنالیز شدند، تعداد ۸ پروتئین شامل پروتئین‌های استئونکتین، کلاستین، کاتپسین، کلاژن تیپ ۲، کندروادهرین، کربنیک انهدراز، اکتیوین A و HSP بین دو نمونه اختلاف داشتند که تغییرات آنها در جدول شماره ۱ آمده است. سطح پروتئین‌های استئونکتین، کلاستین، کاتپسین و کلاژن تیپ ۲ در نمونه‌های مبتلا به استئوآرتروز نسبت به نمونه‌های سالم کاهش یافته و سطح پلی‌پپتید کندروادهرین افزایش بارزی در نمونه‌های مبتلا داشت. همچنین، یافته اصلی این مطالعه کاهش سطح پپتید اکتیوین A در غضروف نرمال در هر ۷ نمونه و غلظت بالای این پپتید در غضروف مبتلا به استئوآرتروز در بررسی same spot progenesis نمونه‌ها بود. در این مطالعه با توجه به نحوه انجام سانتریفوژ با دور بالا، تمامی مولکول‌های کلاژن به‌ویژه تیپ ۲ از نقشه پروتئومی غضروف مبتلا و سالم حذف شدند. وجود Heat shock protein در نمونه‌های مبتلا به استئوآرتروز نشانه نقش بالای این پروتئین در فرآیندهای التهابی مفصلی بود. کندروادهرین از پپتیدهایی است که در این مطالعه در بررسی مقایسه‌ای غضروف‌های نرمال در فقط ۲ نمونه جمع‌آوری شده روی ژل الکتروفورز مشهود بود و در گروه Absent قرار گرفت. نکته جالب این مطالعه عدم وجود مولکول آنزیمی انهدراز کربنیک در غضروف مفصلی مبتلایان به استئوآرتروز بود.

بحث

تمرکز مطالعات در سال‌های اخیر بر شناسایی مارکرهای بیوشیمی جدید در بیماری‌ها جهت تسهیل شناسایی اولیه و بهبود درمان است. پیشرفت در پروتئومیکس و تکنیک‌های تحلیلی، فرصت‌های جدیدی را برای به‌دست آوردن بینش نسبت به عملکرد مایعات بیولوژیک کمپلکس در وضعیت سلامت و بیماری فراهم کرده است. برخی از مطالعات [۸] مشخصات ترشعی غضروف طبیعی و غضروف در بیماران استئوآرتروز را با 2-DE و MS آنالیز کرده‌اند. Blanco و Ruiz-Romero پروتئوم کندروسیت‌های مفصلی نرمال را به‌منظور ایجاد یک ابزار جدید برای مطالعه OA توصیف کرده‌اند [۱۵]. همچنین، در مطالعات مختلف به بررسی پروتئوم کندروسیت‌های غضروف طبیعی در مقابل استئوآرتروز با استفاده از 2-DE پرداخته شده است [۱۶، ۱۵]. در مطالعه حاضر متوجه کاهش سطح آنزیمی کربنیک انهدراز و حضور کلاژن تیپ ۲، کندروادهرین، اکتیوین A و HSP در سطح ژل الکتروفورز شدیم. کلاژن نوع ۲ احتمالاً ایده‌آل‌ترین نشانگر برای مطالعه بازسازی غضروف است. فراوان‌ترین پروتئین در

غضروف، نمایانگر ۲۵ درصد از وزن تر، ۵۰ درصد از وزن خشک، و ۹۰-۹۵ درصد از کل محتوای کلاژن غضروف است. کلاژن نوع ۲ تنها ۱ درصد از همه کلاژن بدن را می‌سازد و تغییر و تبدیل نرمال آن کم است، اما در موارد پاتولوژیک در مفصل، انتظار می‌رود با بالا رفتن سطح اپی‌توپ‌های کلاژن باعث بهبود روند پاتولوژی شود [۱۷]. از آنجا که کلاژن نوع ۲ خاص غضروف هیالین است و به‌وفور در این بافت یافت می‌شود، عمده بیومارکر تغییر و تبدیل غضروف، اپی‌توپ‌های مشتق شده از کلاژن نوع ۲ است [۱۸]. حتی در مبتلایان به استئوآرتروز سطح این کلاژن در تمام بدن از جمله خون و ادرار افزایش می‌یابد و اندازه‌گیری کلاژن نوع ۲ ادرار ممکن است به شناسایی بیماران مبتلا به استئوآرتروز با تغییر و تبدیل بالای غضروف کمک کند، و این بیماران به احتمال زیاد بیشترین پاسخ را به درمان با داروهای اصلاح ساختار نشان می‌دهند [۱۹]. Hermansson و همکاران بیان کردند که کلاژن تیپ ۲ در بیماران مبتلا به استئوآرتروز افزایش می‌یابد که در راستای مطالعه حاضر است [۶]. در مطالعه Kumar و همکاران تفاوتی در بیان کلاژن تیپ ۲ در بیماران استئوآرتروزی و افراد سالم یافت نشد؛ البته در این مطالعه روش بررسی بیان میزان mRNA بود [۲۰]. از آنجا که در مطالعه حاضر طی فرآیند سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه بخش اعظم مولکول‌های کلاژن تیپ ۲ از مجموع نمونه‌ها حذف شدند، اما غلظت بالای این پپتید در مبتلایان به استئوآرتروز باعث شد که علی‌رغم حذف این مولکول از نمونه‌ها همچنان در سطح پائین گزارش شوند. در مطالعه Lambrecht و همکاران نشان داده شد که HSP در نمونه‌های سالم در مقایسه با نمونه‌های مبتلا به استئوآرتروز به‌ظاهر سالم دارای نسبت ۲/۲۸، و در مقایسه بین نمونه‌های سالم و ظاهراً درگیر استئوآرتروز ۲/۵۲ بود که نسبت در نمونه‌ی به‌ظاهر درگیر استئوآرتروزی افزایش یافته است. مطالعه اخیر با توجه به گزارشات فوق هم‌راستا با مطالعه ما می‌باشد [۱۶]. در یک مطالعه دیگر نیز افزایش HSP در بیماران مبتلا به استئوآرتروز نشان داده شده است که در هم‌سویی با مطالعه حاضر است [۱۵]. HSP پروتئین نگهدارنده‌ای است که با ارسال سیگنال به سلول‌ها جهت تولید IGF-1 و IL-1B در تنظیم بیان پروتئین MMP (Matrix metallo proteinase) که پروتئین اصلی در ساختمان غضروف برای ساخت کلاژن می‌باشد، نقش مهمی در بهبود فرآیندهای التهابی در ساختمان غضروف مفاصل آسیب دیده ایفا می‌کند [۲۱]. Activin A در مکان التهاب ساخته می‌شود و نشان داده شده است که در بهبود زخم در موش نقش دارد؛ هم-چنین، باعث افزایش متوسط بیان ژن کلاژن II و سنتز پروتئو-

گلیکان در کندروسیت می‌شود [۲۲]. این پروتئین یک همودیمیر دو زنجیره‌ای از β -Inhibin است و عضو اصلی خانواده β -TGF می‌باشد که در اصل از مایع فولیکولی تخمدان تخلیص شده است. Activin می‌تواند باعث تمایز سلول‌های مزانشیمی یا به-عبارت دیگر کندروژنز شده و به‌عنوان یک سیتوکین بسیار مهم در فرایند آنتی کاتابولیک غضروف عمل کند. هم‌چنین، نقش آن در بهبود زخم نیز ثابت شده است [۲۳]. در این مطالعه افزایش این پروتئین در بیماران مشاهده شد. El-Gendi و همکاران در مطالعه خود افزایش Activin A را در بیماران مبتلا به لوپوس، آرتريت روماتوئید و استئوآرتريت نشان دادند؛ آنها البته ذکر کردند که سطح اکتیوین A در بیماران مبتلا به لوپوس و آرتريت روماتوئید نسبت به استئوآرتريت افزایش بیشتری داشته است [۲۴]. Alexander و همکاران نیز افزایش سطح اکتیوین A را در بیماران مبتلا به استئوآرتريت با طیف ۹۷/۱-۳۴/۹ گزارش نموده‌اند. در این مطالعه بیان شده است که پروتئین اکتیوین توسط کندروسیت در پاسخ به محرک‌های مختلف تولید شده و ممکن است یک نقش تنظیم‌کنندگی در استئوآرتريت بازی کند [۲۳]. در مطالعه حاضر کربنیک انهدراز در بیماران کاهش یافته بود. کربنیک انهدراز-۱ هیدراتاسیون دی‌اکسید کربن را کاتالیز می‌کند و منجر به سنتز بی‌کربنات می‌شود. این آنزیم در فعالیت‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک کلسیفیکاسیون و معدنی شدن استخوان شرکت می‌کند. رسوب کربنات کلسیم در محلول کلرید کلسیم اشباع شده با دی‌اکسید کربن در حضور کربنیک انهدراز استخراج شده از *Citrobacter Freundii* نشان داده شده است. [۲۵]. این نتایج نشان داد که CA1 نه تنها باعث افزایش واکنش هیدراتاسیون دی‌اکسید کربن می‌شود، بلکه ترکیب بی‌کربنات با کلسیم را نیز پیش برده و باعث تشکیل رسوب جامد کربنات کلسیم می‌شود. بنابراین، افزایش بیان CA1 در سینوویوم بیماران ممکن است به رسوب CaCO_3 در بافت‌های بیمار فرد منجر شود [۲]. در مطالعه Chang و همکاران از بین ۵ بیمار مبتلا به استئوآرتريت تنها یک بیمار افزایش کربنیک انهدراز را در نمونه بافت سینوویال و نه بافت غضروف مفصلی نشان داده است [۲۵]. Zheng و همکاران در بررسی مقایسه‌ای میزان کربنیک انهدراز در بیماران مبتلا به اسپوندیلیت انکیلوزان و آرتريت روماتوئید بیان کردند که افزایش سطح کربنیک انهدراز در بیماران ممکن است منجر به تشدید التهاب مفاصل و تخریب بافت مفصلی و سینوویال گردد [۲۶]. در کل مطالعات چندانی بر روی سطح کربنیک انهدراز و نقش آن در مبتلایان به استئوآرتريت انجام نشده است و با توجه به نقش آنزیمی موثر این مولکول در ایجاد رسوبات

کربنات کلسیم می‌تواند راه‌گشای موثری در مبتلایان به استئو-آرتريت باشد. Chondroadherin پروتئین شناخته شده غنی از تکرار لوسین در داخل ماتریکس غضروف مفصلی است که نقش میانجی‌گری برای چسبندگی سلول‌های ایزوله از طریق اینترگرین $\alpha 2\beta 1$ و برای تعامل با کلاژن دارد. مجموعه مونومرهای کلاژن تیپ ۲ و کندروادهرین می‌توانند در شرایط غیر تخریبی از غضروف مفصلی آزاد شده و در ترکیب با سایر مولکول‌های پروتئینی منجر به آزاد شدن ذخایر ماتریکس متالوپروتئیناز شوند [۲۷]. کاتپسین یک پروتئاز اسیدی است که عضوی از خانواده پپتیدازهای آسپارتیک محسوب شده و فراوان‌ترین پروتئیناز داخل کندروسیت می‌باشد. کاتپسین نقش مهمی در شکستن پپتیدهای داخل سلولی داشته و در پاتوژنز بیماری‌های مختلف از جمله سرطان پستان و بیماری آلزایمر موثر است اما نقش آن در تخریب پروتئوگلیکان ماتریکس غضروف داخل مفصلی هنوز مشخص نشده است [۲۸]. به‌نظر می‌رسد این پروتئین در روند استخوانی شدن اندوکندرال نقش داشته باشد [۲۹]. در مطالعه Bo و همکاران در بررسی پروتئومیکس سینوویال مبتلایان به استئوآرتريت و آرتريت روماتوئید و مقایسه پروتئین‌ها افزایش سطح کاتپسین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری گزارش شده است [۳۰]. افزایش آنزیم‌های تنظیم‌کننده ماتریکس در پاتوژنز بیماری‌ها از جمله استئوآرتريت ناشی از ورزش موثر است. ورزش زیاد نه تنها فنوتیپ تغییرات اولیه استئوآرتريت را باعث می‌شود، بلکه به صورت غیرقابل‌انتظاری باعث کاهش درصد کندروسیت‌های کاتپسین مثبت خصوصا در غضروف مجاور به استخوان ساب‌کندرال می‌شود [۳۰]. Rollín و همکاران پروتئوم متفاوتی از کندروسیت‌های مفصلی بیماران استئوآرتیتی را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. پروتئین‌های فراهم شده از کشت کندروسیت-های ۶ بیمار مبتلا به استئوآرتريت مرحله نهایی و ۶ فرد سالم تهیه شدند توسط 2-DE-مورد آنالیز قرار گرفتند. کاتپسین D از مهمترین پروتئین‌های مطرح شده در این مطالعه بود که بیان تغییر یافته این پروتئین با رویدادهایی مانند اتصال اسکلت سلولی، اختلال در پروتئین، آپوپتوز، و گلیکولیز سازگار است. در نتیجه نشان دهنده خطوط تحقیقات جدید در پاتوژنز استئوآرتريت می‌باشد [۲۹]. در این مطالعه کاهش کاتپسین در بیماران استئوآرتريت در راستای نتایج مطالعه حاضر است.

نتیجه‌گیری

بیان متفاوت این پروتئین‌ها نشان‌دهنده توانایی 2-DE, SDS-PAGE در شناسایی پروتئین‌ها متفاوت بیان شده در

بیشتری کسب نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و از طریق طرح تحقیقاتی شماره ۸۹۳۰ صورت گرفته است و همچنین برگرفته از پایان نامه رزیدنتی می باشد. بدین وسیله از همکاری این معاونت کمال تشکر به عمل می آید.

References:

[1] Ding C, Garner P, Cicuttini F, Scott F, Cooley H, Jones G. Knee cartilage defects: association with early radiographic osteoarthritis, decreased cartilage volume, increased joint surface area and type II collagen breakdown. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(3): 198-205.

[2] Conaghan PG, Felson D, Gold G, Lohmander S, Totterman S, Altman R. MRI non-cartilaginous structures in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14 Suppl A: A87-94.

[3] Haq I, Murphy E, Dacre J. Osteoarthritis. *Postgrad Med J* 2003; 79(933): 377-83.

[4] McCauley TR, Disler DJ. MR imaging of the articular cartilage. *Radiology* 1998; 209(3): 629-40.

[5] Aurich M, Squires GR, Reiner A, Mollenhauer JA, Kuettner KE, Poole AR, et al. Differential matrix degradation and turnover in early cartilage lesions of human knee and ankle joints. *Arthritis Rheum* 2005; 52(1): 112-9.

[6] Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, Alexander S, Wallace A, Begum S, et al. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin beta A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 43514-21.

[7] Mobasheri A, Henrotin Y. Biomarkers of Osteoarthritis: A Review of Recent Research Progress on Soluble Biochemical Markers Published Patents and Areas for Future Development. *Recent Pat Biomark* 2011; 1: 25-43

[8] Ali M, Manolios N. Proteomics in rheumatology: a new direction for old diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 56: 67-76.

[9] Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts *Electrophoresis* 1997; 18(11): 2071-7.

[10] Viswanathan S, Unlu M, Minden JS. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1351-8.

[11] Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, Piubelli C, Cecconi D, Campostrini N, et al. Critical survey of quantitative proteomics in two-dimensional electrophoresis approaches. *J Chromatogr A* 2004; 1051(1-2): 3-17.

کندروسیت بیماران مبتلا به استئوآرتریت است. با توجه به عدم وجود مطالعات کافی پروتئومیکس غضروف مفصلی ضرورت انجام مطالعات بیشتر بر روی این ترکیب احساس می شود و توصیه به انجام مطالعات وسیع تر به ویژه با استفاده از روش های دقیق تری هم چون طیف سنجی جرمی بر روی این پروتئین ها می شود تا با شناخت بهتر پاتوژنز استئوآرتریت بتوان در پیشگیری و درمان این بیماری شایع مفصل در آینده موفقیت های

[12] Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003; 3(1): 36-44.

[13] Stults JT, Arnott D. Proteomics. *Methods Enzymol* 2005; 402: 245-89.

[14] De Ceuninck F, Sabatini M, Pastoureau P. Recent progress toward biomarker identification in osteoarthritis. *Drug Discov Today* 2011; 16(9-10): 443-9.

[15] Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18(4): 500-9.

[16] Lambrecht S, Verbruggen G, Verdonk PC, Elewaut D, Deforce D. Differential proteome analysis of normal and osteoarthritis Chondrocyte reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16(2): 163-73.

[17] Lohmander LS, Eyre D. Biochemical Markers as Surrogate end Points of Joint Disease. In: Reid D, Miller C, Eds. *Clinical Trials in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis*. New York: Springer; 2008. p. 249-74.

[18] Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Innes JF, Clegg PD. Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *Vet J* 2010; 185(1): 36-42.

[19] Christgau S, Henrotin Y, Tanko LB, Rovati LC, Collette J, Bruyere O, et al. Osteoarthritic patients with high cartilage turnover show increased responsiveness to the cartilage protecting effects of glucosamine sulphate. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(1): 36-42.

[20] Kumar S, Connor J R, Dodds RA, Halsey W, Van Horn M, Mao J, et al. Identification and initial characterization of 5000 expressed sequenced tags (ESTs) each from adult human normal and osteoarthritic cartilage cDNA libraries. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(7): 641-53.

[21] Ruiz-Romero c, Blanco FJ. The role of proteomics in osteoarthritis pathogenesis research. *Curr Drug Targets* 2009; 10(6): 543-56.

- [22] Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, Alexander S, Wallace A, Begum S, et al. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 43514–21.
- [23] Alexander S, Hermansson M, Wallace AL, Saklatvala J. Activin: a novel regulatory protein in osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* 2006; 365: 87–90.
- [24] El-Gendi SS, Moniem AE, Tawfik NM, Ashmawy MM, Mohammed OA, Mostafa AK, et al. Value of serum and synovial fluid activin A and inhibin A in some rheumatic diseases. *Int J Rheum Dis* 2010; 13(3): 273-9.
- [25] Chang X, Zheng Y, Yang Q, Wang L, Pan J, Xia Y, et al. Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(4): 176.
- [26] Zheng Y, Wang L, Zhang W, Xu H, Chang X. Transgenic mice over-expressing carbonic anhydrase I showed aggravated joint inflammation and tissue destruction. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 13: 256.
- [27] Mansson B, Wenglén C, Mörgelin M, Saxne T, Heinegård D. Association of chondroadherin with collagen type II. *J Biol Chem* 2001; 276(35): 32883-8.
- [28] Handley CJ, Mok MT, Ilic MZ, Adcocks C. Cathepsin D cleaves aggrecan at unique sites within the interglobular domain and chondroitin sulfate attachment regions that are also cleaved when cartilage is maintained at acid pH. *Matrix Biol* 2001; 20(8): 543-53.
- [29] Rollín R, Tornero P, Marco F, Camafeita E, Calvo E, López-Durán L, et al. Differential Proteome of Articular Chondrocytes from Patients with Osteoarthritis. *J Proteomics Bioinform* 2008; 1(5): 267-80.
- [30] Bo GP, Zhou LN, He WF, Luo GX, Jia XF, Gan CJ, et al. Analyses of differential proteome of human synovial fibroblasts obtained from arthritis. *Clin Rheumatol* 2009; 28(2): 191-9.