Original Article

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

Zamani B[1*], Khosravi Gh[2], Rezaei-Tavirani M[3], Hashemi-Takhonche M[4], Heidari-Keshel S[3]

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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

مقایسه پروتئومیکس کندروسیت غضروف بیماران مبتلا به استئوآرتریت با غضروف طبیعی

بتول زمانی [۱*]، غلامرضا خسروی [۲]، مصطفی رضائی طاویرانی [۳]، مرضیه هاشمی طاخونچه [٤]، سعید حیدری کشل [٥]

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 به‌منظور فهم پاتوژنز استئوآرتریت به بررسی پروتئوم کندورسیت 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 استئونکتین، کلاسترین، کاتپسین، کلاژن تیپ ۲، کندروادهرین، کربنیک انهیدراز، اکتیوین A و Heat shock protein (HSP) بین دو نمونه اختلاف داشتند که تغییرات آنها به‌صورت زیر می‌باشد: سطح پروتئین‌های استئونکتین، کلاسترین، کاتپسین و کلاژن تیپ ۲ در نمونه‌های مبتلا به استئوآرتریت نسبت به نمونه‌های سالم کاهش یافته و سطح پلی‌پپتید کندروادهرین و آکتین 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 ۱٦٦-۱٥۹

مقدمه

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 [٤]. غضروف نرمال خیلی اختصاصی و سطح صاف و صیقلی دارد. عصب لنف 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

[٤] دستیار، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[٥] استادیار، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* **نشانی نویسنده مسئول:**

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، 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

حفظ غضروف توسط سلول‌های اختصاصی کندروسیت است که تقریبا ۲ درصد حجم غضروف را در افراد بالغ شامل می‌شود. ماتریکس غضروف به‌طور اساسی از کلاژن‌ها (اغلب کلاژن نوع II و به‌مقدار کمتر از دیگر کلاژن‌ها) پروتئوگلیکان‌ها وآگریکان تشکیل شده است [۵]. تخریب غضروف در OA شامل تخریب در ماکرومولکول‌های ماتریکس و تغییر در بروز پروتئین‌های کندروسیت است [٦]. 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 به‌صورت آزاد در مایعات بیولوژیک، متصل به غشا و یا درون سلول وجود دارند. واژه پروتئومیکس در اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی ابداع شد [۸]. بعدا 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

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 drsorption 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 تصویربرداریکمک خواهد کرد [۱٤]. 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 و نمونه بلافاصله درون نیتروژن مایع قرار گرفت تا الگوی پروتئینی آن تغییر نکند. در مرحله‌ی 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 (٤ درجه) جهت جلوگیری از به‌هم 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 به‌مدت ٤ روز با حدود ۱۲ میلی‌لیتر بافر (حاوی ٤ مول گوانیدین HCL و ۵۰ میلی‌مول سدیم استات) قرار داده شد. مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه تحت سانتریفوژ 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، معمولا تفکیک و نمایش محصولات پروتئینی موجود در نمونه است؛ بنابراین به‌منظور دست‌یابی به حداکثر میزان تفکیک، روش الکتروفورز دوبعدی (DE ۲) 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 و بسته به pH ایزوالکتریک خود روی نوار استریپ تفکیک شدند. روز سوم بعد دوم الکتروفورز دوبعدی یعنیSDS page پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی تفکیک گردیدند. در این مرحله پس از آماده کردن ژل بر پایه پلی اکریل آمید، 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 نیترات 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 دتکتور، می‌توان به‌طور

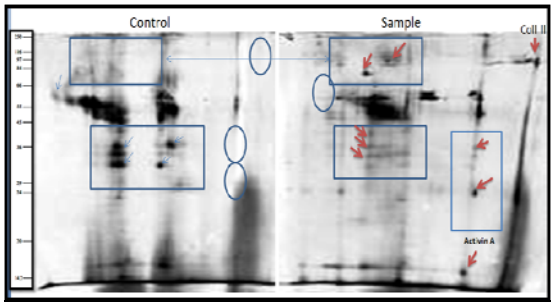
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

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 پروتئو-میکس 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 ٦٤/٧ سال و میانگین طول مدت بیماری آنها ٦/٢٨ سال بود. درگیری مفصل زانو در ٤ بیمار و درگیری مفصل هیپ در ۳ بیمار وجود داشت. شکایت اصلی تمام بیماران (۱۰۰ درصد) درد بوده و حدود ٤٢ درصد بیماران (۳ نفر) از تورم مفصل 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:

NL=7 OA=7



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

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

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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

در این مطالعه از بین ۲۵ پروتئین که بر اساس وزن مولکولی و pH ایزوالکتریک آنالیز شدند، تعداد ۸ پروتئین شامل پروتئین‌های استئونکتین، کلاسترین، کاتپسین، کلاژن تیپ ۲، کندروادهرین، کربنیک انهیدراز، اکتیوین A و HSP بین دو نمونه اختلاف داشتند که تغییرات آنها در جدول شماره ۱ آمده است. سطح پروتئین‌های استئونکتین، کلاسترین، کاتپسین و کلاژن تیپ ۲ در نمونه‌های مبتلا به استئوآرتریت 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 استئوآرتریت 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 استئوآرتریت 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 انهیدراز کربنیک در غضروف مفصلی مبتلایان به استئوآرتریت 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 ترشحی غضروف طبیعی و غضروف در بیماران استئوآرتریت. را با 2-DE و MS آنالیز کرده‌اند. Ruiz-Romero و Blanco پروتئوم کندروسیت-های 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 استئو-آرتریت با استفاده از 2-DE پرداخته شده است [۱۶،۱۵]. در مطالعه حاضر متوجه کاهش سطح آنزیمی کربنیک انهیدراز و حضور کلاژن تیپ ۲، کندروادهرین، اکتیوین A و HSP در سطح ژل الکتروفورز شدیم. کلاژن نوع ۲ احتمالا ایده‌آل‌ترین نشان‌گر برای مطالعه بازسازی غضروف است. فراوان‌ترین پروتئین در غضروف، نمایان‌گر ۲۵ درصد از وزن تر، ۵۰ درصد از وزن خشک، و ۹۵-۹۰ 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 بالارفتن سطح اپی‌توپ‌های کلاژن باعث بهبود روند پاتولوژی شود [۱۷]. از آنجا که کلاژن نوع ۲ خاص غضروف هیالن 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 استئوآرتریت 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 استئوآرتریت 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 استئوآرتریت افزایش می‌یابد که در راستای مطالعه حاضر است [٦]. در مطالعه Kumar و همکاران تفاوتی در بیان کلاژن تیپ ۲ در بیماران استئوآرتریتی و افراد سالم یافت نشد؛ البته در این مطالعه روش بررسی بیان میزان mRNA بود [۲۰]. از آنجا که در مطالعه حاضر طی فرآیند سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤ درجه بخش اعظم مولکول‌های کلاژن تیپ ۲ از مجموع نمونه‌ها حذف شدند، اما غلظت بالای این پپتید در مبتلایان به استئوآرتریت 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 استئوآرتریت به‌ظاهر سالم دارای نسبت ۲/۲۸، و در مقایسه بین نمونه‌های سالم و ظاهرا درگیر استئوآرتریت ۲/۵۲ بود که نسبت در نمونه‌ی به ظاهر درگیر استئوآرتریتی افزایش یافته است. مطالعه اخیر با توجه به گزارشات فوق هم‌راستا با مطالعه ما می-باشد [۱٦]. در یک مطالعه دیگر نیز افزایش HSP در بیماران مبتلا به استئوآرتریت نشان داده شده است که در هم‌سویی با مطالعه حاضر است [۱۵].HSP پروتئین نگهبانی است که با ارسال سیگنال به سلول‌ها جهت تولید IGF-1 و IL-1B در تنظیم بیان پروتئین MMP (Matrix metalo 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-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

گلیکان در کندروسیت می‌شود [۲۲]. این پروتئین یک همودیمر دو زنجیره‌ای از Inhibin β 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 به‌عبارت دیگر کندروژنزیس 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، آرتریت روماتوئید و استئوآرتریت نشان دادند؛ آنها البته ذکر کردند که سطح اکتیوین A در بیماران مبتلا به لوپوس و آرتریت روماتوئید نسبت به استئوآرتریت افزایش بیش‌تری داشته است [۲٤]. Alexander و همکاران نیز افزایش سطح اکتیوین A را در بیماران مبتلا به استئوآرتریت با طیف ۳٤/۹-۹۷/۱ 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 تنظیم کنندگی در استئوآرتریت بازی کند [۲۳]. در مطالعه حاضر کربنیک انهیدراز در بیماران کاهش یافته بود. کربنیک انهیدراز-۱ هیدراتاسیون دی اکسید 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 دی اکسید کربن در حضور کربنیک انهیدراز استخراج شده از *Citrobacter Freundii* نشان داده شده است. [۲۵]. این نتایج نشان داد که CA1 نه تنها باعث افزایش واکنش هیدراتاسیون دی اکسید 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 $CaCO_3$ دربافت‌های بیمار فرد منجر شود [۲]. در مطالعه Chang و همکاران از بین ۵ بیمار مبتلا به استئوآرتریت تنها یک بیمار افزایش کرنیک انهیدراز را در نمونه بافت سینوویال و نه بافت غضروف مفصلی نشان داده است [۲۵]. Zheng و همکاران در بررسی مقایسه‌ای میزان کربنیک انهیدراز در بیماران مبتلا به اسپوندیلیت انکیلوزان و آرتریت روماتوئید بیان کردند که افزایش سطح کربنیک انهیدراز در بیماران ممکن است منجر به تشدید التهاب مفاصل و تخریب بافت مفصلی و سینوویال گردد [۲٦]. در کل مطالعات چندانی بر روی سطح کربنیک انهیدراز و نقش آن در مبتلایان به استئوآرتریت انجام نشده است و با توجه به نقش آنزیمی موثر این مولکول در ایجاد رسوبات کربنات کلسیم می‌تواند راه‌گشای موثری در مبتلایان به استئوآرتریت باشد. Chondroadherin پروتئین شناخته شده غنی از تکرار لوسین در داخل ماتریکس غضروف مفصلی است که نقش میانجی‌گری برای چسبندگی سلول‌های ایزوله از طریق اینتگرین α2β1 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 استئوآرتریت و آرتریت روماتوئید و مقایسه پروتئین‌ها افزایش سطح کاتپسین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری گزارش شده است [۳۰]. افزایش آنزیم‌های تنظیم کننده ماتریکس در پاتوژنز بیماری‌ها از جمله استئوآرتریت ناشی از ورزش موثر است. ورزش زیاد نه تنها فنوتیپ تغییرات اولیه استئوآرتریت را باعث می‌شود، بلکه به صورت غیرقابل انتظاری باعث کاهش درصد کندروسیت‌های کاتپسین مثبت خصوصا در غضروف مجاور به استخوان ساب کندرال می‌شود [۳۰]. Rollín و همکاران پروتئوم متفاوتی از کندروسیت‌های مفصلی بیماران استئوآرتریتی را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. پروتئین‌های فراهم شده از کشت کندروسیت‌های ٦ بیمار مبتلا به استئوآرتریت مرحله نهایی و ٦ فرد سالم تهیه شدند توسط 2-DE مورد آنالیز قرار گرفتند. کاتپسین D از مهمترین پروتئن‌های 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 استئوآرتریت می‌باشد [۲۹]. در این مطالعه کاهش کاتپسین در بیماران استئوآرتریت در راستای نتایج مطالعه حاضر است.

نتیجه‌گیری

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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

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 می‌شود و توصیه به انجام مطالعات وسیع‌تر به‌ویژه با استفاده از روش‌های دقیق‌تری هم‌چون طیف سنجی جرمی بر روی این پروتئین‌ها می‌شود تا با شناخت بهتر پاتوژنز استئوآرتریت بتوان در پیشگیری و درمان این بیماری شایع مفصل در آینده موفقیت‌های 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 پایان‌نامه رزیدنتی می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری این معاونت کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

References:

[1] Ding C, Garnero 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.

[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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

[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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]