دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۲، صفحه ۱۴۹ – ۱۴۱ (خرداد و تیر ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(2): 141-149

# آنالیز داده‌های متابونومیکس به‌دست آمده از طیف‌سنجی تشدید مغناطیس هسته 1H NMR جهت ارائه مسیرهای متابولیکی بیماری آرتریت روماتوئید

محمد ارجمند[۱]، آتوسا گلشاهی[۱]، علی موحد[۲،۳*]، اعظم امینی[۴]، زیبا اکبری[۱]

[۱] گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران

[۲] مرکز تحقیقات پزشکی هسته‌ای، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

[۳] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

[۴] گروه روماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

(دریافت مقاله: ۹۱/۶/۱۸– پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۲۴)

## چکیده

**زمینه:** آرتریت روماتوئید از بیماری‌های اکتسابی بافت همبند می‌باشد و دارای زیر گروه‌های گوناگونی است که دربیشتر اوقات علت اصلی آن را نمی‌توان مشخص نمود. هدف از این مطالعه، کاربرد اسپکتروسکوپی 1HNMR جهت بررسی نمای متابولیکی و کسب اطلاعات بیوشیمیایی خون انسان سالم و مقایسه متابولوم آن‌ها با سرم خون بیمار آرتریت روماتوئیدی فعال می‌باشد. متابونومیکس بر پایه NMR، برای آنالیز سریع نمونه‌های بیولوژیکی مناسب بوده و روش اسپکتروسکوپی 1HNMR، نسبت به‌روش‌های دیگر آنالیز، ارجحیت دارد. آنالیز بیماری به‌کمک تشدید مغناطیس هسته به تشخیص زود هنگام بیماری نیز منجر می‌گردد. بدیهی است، این تشخیص زود هنگام می‌تواند، تأثیر زیادی در کیفیت زندگی و روند بهبود این دسته از بیماران بنماید. در این مطالعه هدف ما بررسی پروفایل متابولیکی سرمی بیماران آرتریت روماتوئید به‌منظور شناسائی بیومارکر جدید و الگوی متابولیکی در این بیماران می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** به منظور بررسی متابولومیکس بیماران آرتریت روماتوئید از سرم خون ۱۶ بیمار که در فاز فعال بیماری آرتریت روماتوئید بودند و ۱۶ فرد سالم که از نظر جنس و سن مشابه گروه بیمار بودند استفاده شد. در تمام نمونه‌ها، حضور فاکتور روماتوئیدی آرتریت از طریق افزایش در مقدار T1 مایع سینوویال مفصلی نشان داده شده است. در این مطالعه به کمک روش‌های PCA و PLSDA و همچنین نرم‌افزارهای کنومکس و کد محاسباتی پرومتب در محیط متلب تمامی متابولیت‌های موجود در این بیماری را طبقه‌بندی شد و یافته‌ها با بانک داده‌های متابولیتی HNMR (www.metabolomics.ca) مقایسه شد. همچنین آزمون‌های، ANA (Anti Nucleair Antibody) و Anti ccp (Anti cyclic citrullinated peptide) و اوره نیز به‌کمک روش الایزا و رنگ‌سنجی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در این بررسی، مسیرهای متابولیکی که بیشترین تغییرات را داشته‌اند عبارتند از مسیر بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی، متابولیسم بیوتین، بیوسنتز اسیدهای چرب، مسیر بیوسنتز اسیدهای آمینه والین، لوسین و ایزولوسین و همچنین متابولیسم اسیدهای چرب لینولئیک شناسائی شدند.

**نتیجه‌گیری:** در بیماری روماتیسم و بیماری‌های مزمن التهابی، فعال شدن دستگاه دفاعی باعث مصرف بیش ازحد انرژی می‌گردد، ATP بهترین منبع انرژی درون سلولی است و از مسیرهای گلیکولیزوفسفوریلاسیون اکسیداتیو به‌دست می‌آیند. تغییرات مشاهده شده در مسیر سنتز و ورود به سیکل کربس اسیدهای آمینه والین و لوسین و همچنین سنتز اسیدهای چرب آزاد نیز تأیید کننده نیاز بالای انرژی می‌باشد. در این افراد، افزایش سنتز و کاتابولیسم اسیدهای چرب منجر به تولید استیل‌کوا و سنتز اجسام کتونی می‌گردد. با توجه به اینکه بیماری روماتیسم زیر گروه‌های مختلفی داشته، و نیاز به روش‌های دقیق‌تری جهت تشخیص می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد با استفاده از الگوی به‌دست آمده از این مطالعه می‌توان به پیدایش بیومارکرهای جدید در تشخیص زود هنگام بیماری روماتیسم کمک نمود.

**واژگان کلیدی:** متابونومیکس، اسپکتروسکوپی NMR، PLSDA، PCA، Pattern recognition و آرتریت روماتوئید.

* بوشهر، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

**Email**: **amovahed58@gmail.com**

Archive of SID

www.SID.ir

## مقدمه

آرتریت روماتوئید بیماری سیستمیک مزمن و بهبود ناپذیری است، که عمدتاً بانوان را گرفتار می‌کند، و حدودا ۱ درصد جمعیت دنیا به آن مبتلا می‌باشند (۱).

در این بیماری مفاصل به‌طور قرینه درگیر شده و این امر منجر به تخریب غضروف و ایجاد ضایعات استخوانی می‌گردد (۲). تغییرات بیوشیمیائی در مایع سینوویال بیماران آرتریت روماتوئیدی، با واکنش اکسیداسیون کامل اسید هیپوکلروس که به‌وسیله میلوپراکسیداز از نوتروفیل موجود در حفره مفصلی ملتهب حاصل شده، انجام می‌پذیرد (۳). در آرتریت روماتوئید، سرعت رسوب اریتروسیت‌ها افزایش می‌یابد و آزمون پروتئین فعال (CRP) مثبت می‌شود.

همچنین،آزمون سرم فاکتور روماتوئیدی (RF) در تشخیص آرتریت روماتوئید نیز استفاده می‌شود، که در حدود۸۰ درصد بیماران آرتریت روماتوئیدی مثبت و در ۲۰ درصد بیماران منفی گزارش می‌شود. بنابراین، تشخیص سریع آرتریت روماتوئید برای تعیین نوع درمان بیماران، امری مهم تلقی می‌گردد و یافتن آنتی‌بادی‌های ضدپپتیدهای حلقوی سیترولینه (Anti-ccp) در این بیماری حکایت از شدت بیماری دارد (۴ و ۵) هر چند در تمامی بیماران این پپتید مثبت گزارش نمی‌گردد (۴) و تشخیص به راحتی انجام نمی‌گیرد و در نتیجه درمان با تأخیر انجام می‌شود. مسیرهای متابولیکی باعث تولید انرژی جهت واکنش‌های دفاعی سلول گردیده و از سویی انرژی مصرفی سلول‌های ملتهب مزمن را نیز به‌عهده دارند که این مهم می‌تواند به‌عنوان هدف درمانی مورد استفاده قرار گیرد (۶).

متابولومیکس[1] علم نوظهور و نوینی است که به کمک آن می‌توان الگوی متابولوم یک سیستم را در یک واحد زمانی مورد مطالعه قرار داد (۷). با استفاده از دستگاه تشدید رزونانس مغناطیس هسته (NMR) می‌توان به پروفایل متابولوم بر اساس ساختار شیمیائی ملکول و به‌منظور تشخیص زودرس بیماری‌ها دست یافت (۸). با توجه به اینکه بیماری روماتیسم زیر گروه‌های مختلفی داشته، و همچنین پاسخ آن‌ها به درمان یکسان نمی‌باشد. بنابراین شناسائی بیومارکرهای جدید می‌تواند به تشخیص دقیق‌تر و سریع‌تر بیماری بیانجامد (۹) لذا در این مطالعه، با به‌کارگیری پروتون اسپکتروسکوپی NMR وضعیت الگوی متابولیکی موجود در سرم خون بیماران آرتریت روماتوئیدی مورد ارزیابی قرار داده شد، و ضمن مقایسه پروفایل متابولوم گروه بیمار با افراد سالم، سعی بر شناسائی مارکرهای جدیدی در این بیماری گردید.

## مواد و روش‌ها

گروه آزمایش شامل ۱۶ فرد بیمار ۲۵ تا ۶۸ ساله مبتلا به فاز فعال بیماری آرتریت روماتوئید و گروه شاهد شامل ۱۶ انسان سالم، با محدوده سنی مشابه به‌صورت تصادفی از مراجعه کنندگان به مطب خصوصی مورد نظر در شهر بوشهر انتخاب شدند.

کلیه بیماران با تأئید پزشک متخصص و قبل از شروع به درمان انتخاب گردیده. از کلیه افراد پس از اخذ رضایت‌نامه مطابق با ضوابط مصوب وزارت بهداشت، خون‌گیری به‌عمل آمده و بلافاصله سرم جدا گردیده و تا زمان انجام آزمایشات در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای حصول اطمینان از وضعیت بیماری گروه آزمایش و همچنین گروه شاهد آزمون‌های کنترلی (گلد استاندارد) Anti ccp،ANA با روش الایزا (۹) و آزمایش اوره به‌روش کالری‌متری انجام گردید (۱۰). کلیه مواد مورد نیاز از شرکت‌های سیگما (Sigm) و مرک (Merck)تهیه شدند.

[1] Metabonomics

Archive of SID
http://bpums.ac.ir
www.SID.ir

**آماده‌سازی نمونه‌ها جهت طیف‌سنجی**

۶۰۰ میکرولیتر سرم از هر نمونه برداشته و در پروب مخصوص دستگاه NMR قرار داده شد. همچنین به‌منظور جلوگیری از تداخل منحنی‌های OH مربوط به آب، به هنگام طیف‌سنجی 1H NMR، به نسبت ۱۰ درصد وزنی، D2O به هر کدام از نمونه‌ها افزوده شد و جهت ثبت نقطه صفر طیف، از تریمتیل- سیلیل- پروپیونات– سدیم (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) آب دوتره (D2O) به‌عنوان مرجع خارجی جابجائی شیمیایی به میزان ۵۰ میکرولیتر (۱ میلی‌مول/لیتر) استفاده گردید (۱۱)

**طیف‌سنجی تشدید مغناطیس هسته**

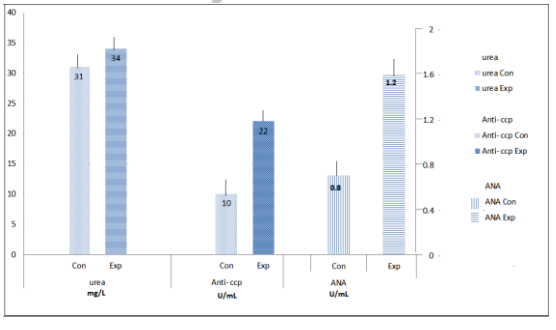
با توجه به وجود ماکرو مولکول‌های با وزن مولکولی بالا در کنار میکرو ملکول‌های سرم در این مطالعه از پروتکل 1D 1H CPMG spin–echo NMR استفاده گردید و برای طیف‌سنجی از دستگاه NMR بروکر ۵۰۰MHZ استفاده شد. پروتکل به‌صورت [td-۱۸۰ -td]– n۹۰ تعریف شده و مقدار td۳۰ میلی‌ثانیه و n۱۰۰ انتخاب گردید. دمای پروب در ۲۹۸ درجه کلوین تنظیم گردید و برای اشباع کردن منحنی آب به‌مدت ۳ ثانیه عمل اشباع انجام گردید (۱۲).

آنالیز داده‌ها

کد محاسباتی ProMetab، یک ابزار آنالیز داده‌های متابونومیکس حاصل از اسپکتروسکوپی تشدید رزونانس هسته بوده که در محیط نرم‌افزار متلب (Matlab) مورد استفاده قرار می‌گیرد. متلب محیط محاسباتی است که قادر به محاسبات تحلیلی و عددی نظیر رسم نمودار، تعریف و استفاده از متغیرها، ساخت و احضار توابع و غیره می‌باشد (۱۳). به کمک این کد، طیف خام NMR را، به یک فرمت آماده جهت آنالیز آزمون چند متغیره تبدیل شد. پیک مربوط به آب را در محل جابجائی شیمیائی ۴/۵ تا ۵ حذف کرده و منحنی‌های ناخواسته موجود در محل‌های جابجائی شیمیائی ppm (۵/۴،۲/۲)، (۵،۶/۵)، (۱/۱،۲۵/۱۳)، (۳/۳۶۵، ۳/۶۹۵)، (۵-۰/۲)را به سبب طیف‌های مزاحم، حذف نمودیم. طیف‌هارا بر اساس ۰/۰۰۵ دسته‌بندی کرده (بینینگ) و بر اساس روش ترانسفورماسیون نرمالایز (normalize) شدند.

داده‌های به‌دست آمده را به کمک کد محاسباتی آنالیز اجزاء اصلی (PCA) و همچنین حداقل مربعات جزئی PLSDA مورد آنالیز قرار گرفت و داده‌ها بر اساس آزمون پارتو آماده سازی شدند. نقطه جابجائی شیمیائی متابولیت‌های متمایز شده را جدا نمودیم و به کمک بانک اطلاعات متابولوم انسانی، متابولیت‌های غیرهمسان را در دو گروه آزمایش و نرمال مشخص نمودیم. همچنین به‌وسیله متابولیت‌های مشخص شده مسیرهای شیمیائی که متابولیت‌ها در آن وجود داشتند را به کمک نرم‌افزارهای اختصاصی متابو آنالیز مشخص نمودیم (۱۴).

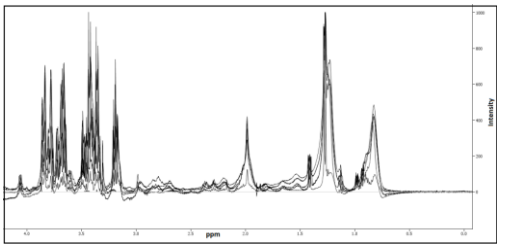
جهت حصول اطمینان از وضعیت بیمار و تأیید بیماری و یا عدم بیماری، آزمون‌های روتین استاندارد، از قبیل ANA و Anti ccp و اوره انجام گرفت و نتایج این دسته از آزمایشات به‌کمک آزمون t'-Test در محیط اکسل مورد بررسی قرار گرفت و مقدار پی (P) در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ پذیرفته شد (شکل ۶-۱).



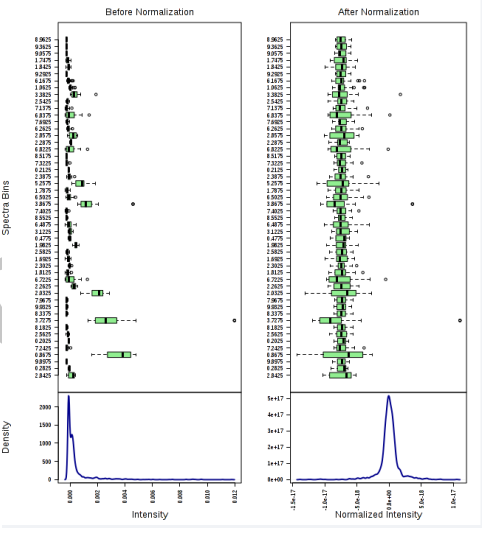

شکل ۱) مقایسه غلظت اوره،Anti-ccp و ANA در گروه شاهد (Con) و آزمایش (Exp)

Archive of SID

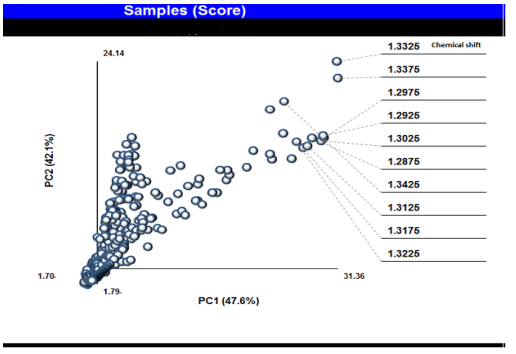

www.SID.ir



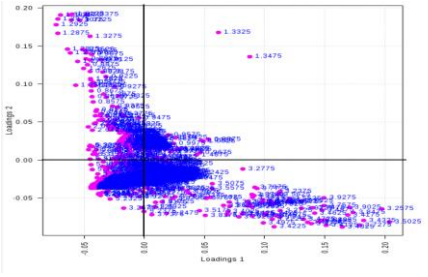
شکل ۲) طیف حاصله از نمونه‌های منطبق شده نرمال و گروه آزمایش طیف‌های منطبق شده نمونه بیمار و سالم، محور x جابجائی شیمیائی بر حسب ppm محور Y، شدت است.



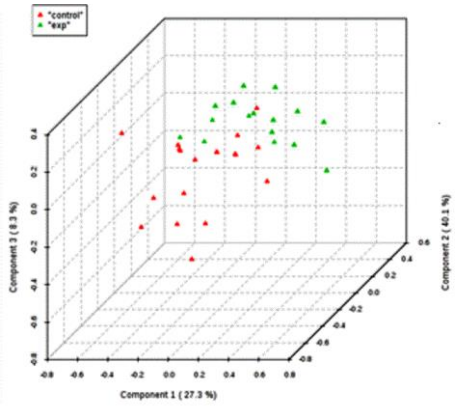

شکل ۳) جابجائی شیمیائی داده‌ها قبل و بعد از نرمالیزاسیون بر اساس متد پارتو (Pareto)



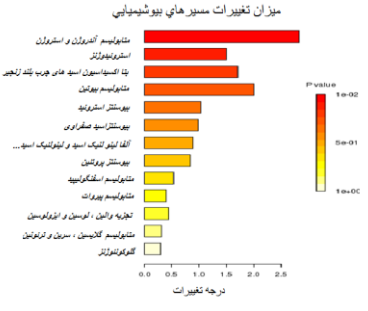

شکل ۴) جداسازی متابولیت‌ها بر اساس تست آنالیز اجزاء اصلی و مقایسه PC1 Vs. PC2 ده متابولیت جدا شده بر اساس طیف‌سنجی NMR



شکل ۵) جداسازی متابولیت‌ها بر اساس تست رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLSDA) و مقایسه loading 1 vs loading 2



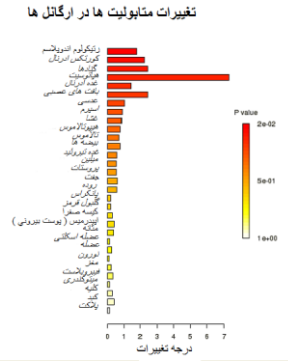

شکل ۶) جداسازی سه بعدی متابولیت‌ها (Scor plot) بر اساس تست رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLSDA)




شکل۷) مسیرهای تغییریافته در بیماری روماتوئیدآرتریت بر اساس وزن تغییرات (P)

Archive of SID


www.SID.ir




شکل ۸) محل و درجه تغییرات مسیرها در بیماری روماتوئید آرتریت بر اساس جایگاه درون سلولی ارگانل‌ها و مقدار (P)

## یافته‌ها

یافته‌های این مطالعه نشانگر افزایش غلظت اوره در گروه بیمار می‌باشد، هر چند آنالیز داده‌های متابونومیکس نشانگر تغییرات بسیاری در الگوی مسیرهای بیوشیمیائی مانند سنتز هورمون‌های استروئیدی و مسیرهای متابولیسم بیوتین، بیوسنتز اسیدهای چرب، سنتز والین، لوسین و ایزولوسین، متابولیسم اسیدهای لینولئیک، متابولیسم تورین و هیپوتورین، متابولیسم اسفینگولیپیدها، گلیکولیز و گلوکونئوژنیز، متابولیسم پیروات، بیوسنتز آمینوترانسفراز و متابولیزم پیروپیونات و همچنین تجزیه والین، لوسین و ایزولوسین می‌باشد. (جدول ۱) و (شکل ۷–۸)

**جدول ۱) مسیرهای بیوشیمیائی تغییریافته در بیماری روماتوئید آرتریت بر اساس میزان (P)**

| مسیرهای بیوشیمیایی | تعداد متابولیت‌ها در مسیر بیوشیمیائی | تعداد متابولیتهای تغییر یافته در مسیر بیوشیمیائی | میزان خطای اصلی (p value) | میزان خطای نوع اول (p. value) کاذب مثبت | میزان خطای نوع دوم کاذب منفی |
|---|---|---|---|---|---|
| بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی | ۹۹ | ۱۸ | ۰/۰۰۰۰۰۰۰۰۰۲۴۸ | ۰/۰۰۰۰۰۰۰۱۹۸- | ۰/۰۰۰۰۰۰۰۱۹۷- |
| متابولیسم بیوتین | ۱۱ | ۲ | ۰/۰۳۳۷۵۷- | ۱ | ۱ |
| بیوسنتز اسیدهای چرب | ۴۹ | ۴ | ۰/۰۴۱۳۴۵- | ۱ | ۱ |
| بیوسنتز اسیدهای صفراوی اولیه | ۴۷ | ۳ | ۰/۱۳۱۱۸۵- | ۱ | ۱ |
| بیوسنتز والین، لوسین، ایزولوسین | ۲۷ | ۲ | ۰/۱۶۴۰۴- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم لینولئیک اسید | ۱۵ | ۱ | ۰/۳۳۷۵۸- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم تورین و هیپوتورین | ۲۰ | ۱ | ۰/۴۲۲۸۹- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم اسفنگولیپیدها | ۲۵ | ۱ | ۰/۴۹۷۳۶- | ۱ | ۱ |
| گلیکولیز یا گلوکونئوژنز | ۳۱ | ۱ | ۰/۵۷۴۳۲- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم پیروات | ۳۲ | ۱ | ۰/۵۸۵۹۶- | ۱ | ۱ |
| بیوسنتز آمینوآسیل tRNA | ۷۵ | ۲ | ۰/۶۰۸۸۴- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم پروپانوئات | ۳۵ | ۱ | ۰/۶۱۹۰۵- | ۱ | ۱ |
| والین، لوسین، ایزولوسین تجزیه | ۴۰ | ۱ | ۰/۶۶۸۵- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم فروکتوز و مانوز | ۴۸ | ۱ | ۰/۷۳۴۷۹- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم گلایسین، سرین و ترئونین | ۴۸ | ۱ | ۰/۷۳۴۷۹- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم پورفیرین و کلروفیل ll | ۱۰۴ | ۲ | ۰/۷۸۱۲۱- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم آراشیدونیک اسید | ۶۲ | ۱ | ۰/۸۲۰۸۴- | ۱ | ۱ |
| متابولیسم آرژنین و پرولین | ۷۷ | ۱ | ۰/۸۸۲۶۳- | ۱ | ۱ |

## بحث

آرتریت روماتوئید بیماری سینوویت مزمن التهابی است، که عواملی مانند عفونت و یا آسیب‌های مفصلی ناشی از تصادف ممکن است باعث ایجاد آن شود. شیوع بیماری روماتیسم رابطه مستقیمی با جنس و سن بیمار دارد (۱۵ و۱۶) و زنان بیشتر از مردان مستعد این بیماری می‌باشند. رابطه هورمون‌های استروئیدی با سیستم دفاعی و عروقی و همچنین بیماری روماتیسم

Archive of SID


www.SID.ir

توسط ماسی (Masi) در سال ۱۹۹۵ مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶).

برخلاف مردان در زنان بیشتر هورمون‌های استروئیدی توسط قشر سطحی کورتکس آدرنال ساخته می‌شود. در مطالعه پیش‌رو، مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی در این بیماران نسبت به گروه سالم بیشترین تغییر الگوی متابولیکی را نشان می‌دهد که با مطالعه ماسی در سال ۱۹۹۵ مطابقت کامل داشته است. از سویی الگوی تغییر یافته در متابولیسم بیوتین در رده دوم این تغییرات قرار داشته است. بیوتین یکی از ویتامین‌های گروه ب کمپلکس می‌باشد که فرم بیوسیتین آن به اسید آمینه لیزین چسبیده و به‌صورت ویتامین غیرفعال می‌باشد. اما قبل از هر گونه فعالیت فیزیولوژیکی، اسید آمینه لیزین باید از این مولکول جدا شود. بیوتین در تولید انرژی توسط سلول نقش به‌سزائی داشته و همچنین در سنتز و فعالیت DNA تأثیرگذار است. در بیماران روماتوئیدی تولید و مصرف انرژی دست خوش تغییراتی می‌باشد که با این الگوی تغییرات بیوتین هم‌خوانی دارند. در بیماران روماتوئیدی و همچنین بیماری‌های مزمن التهابی میزان استفاده انرژی سلولی به‌صورت بسیار زیادی افزایش می‌یابد که این میزان تا دو هزار کیلو ژول در روز می‌تواند باشد (۶).

در تحقیقات انجام گرفته توسط ناقتون (Naughton) و گروه (۲۰۰۳) مشخص گردیده که، سطح گلوکز و شیلومیکرون (لیپوپروتئین با دانسیته اندک) الحاقی به تری‌آسیل گلیسرول مایع سینوویال بیماران آرتریت روماتوئیدی کاهش یافته ولی سطح لاکتات و اجسام کتونی افزایش می‌یابد (۱۶).

از سویی افزایش اسید اوریک و لاکتات دی‌هیدروژناز نیز در این گروه از بیماران می‌شود (۳). کاهش میزان گلوکز در مایع سینوویال از مارکرهای نشان‌دهنده ایجاد التهاب و یا عفونت در مفصل‌ها می‌باشد (۱۷). در بیماری روماتیسم و بیماری‌های مزمن التهابی، فعال شدن دستگاه دفاعی باعث مصرف بیش از حد انرژی تا میزان ۲۰۰۰ کیلو ژول در روز می‌گردد (۱۸) و بهترین منبع انرژی درون سلولی ملکول ATP است که از مسیرهای گلیکولیز و فسفوریلاسیون اکسیداتیو به‌دست می‌آیند. سلول‌ها گلوکز را توسط فرایندگلیکولیز در سیتوزول به پیروات و در میتوکندری پیروات را به آب و دی اکسیدکربن تبدیل می‌کنند و نهایتاً به کمک چرخه کربس و زنجیر انتقال الکترون به انرژی تبدیل می‌کنند. اسیدهای آمینه والین و لوسین و همچنین اسیدهای چرب آزاد نیز در تولید انرژی توسط چرخه کربس نقش به‌سزائی دارند. در این تحقیق سنتز و متابولیسم اسیدهای آمینه مانند والین، لوسین و ایزولوسین و همچنین اسیدهای چرب تغییراتی را نشان می‌دهند و الگوی متابولیتی آن‌ها در مقایسه با گروه شاهد کاملاً متفاوت است. این تغییرات همان‌گونه که در شکل ۸ مشخص می‌باشد، بیشتر در سلول‌های هپاتوسیت مشهود بوده و در ارگانل‌هایی مانند شبکه آندوپلاسمیک و همچنین در قشر کورتکس کلیه و گنادها نیز دیده می‌شود. تغییرات الگوی متابولیتی در گروه بیمار بیشتر معطوف به مسیرها و چرخه‌های تولید و مصرف انرژی از یک طرف و از طرفی دیگر تولید و سنتز هورمون‌های استروئیدی که باعث التهاب و مصرف بالای انرژی می‌شود، می‌باشد.

با توجه به تغییرات بتا- هیدروکسی بوتیرات نیز می‌توان پیشنهاد داد که افزایش غلظت اجسام کتونی، نشان‌دهنده افزایش مصرف چربی است. اجسام کتونی، در محیط‌های آبی، قابلیت حلالیت نسبتاً زیادی داشته، که این امر انتقال آن‌ها را، به محل‌های مورد نیاز

Archive of SID


www.SID.ir

تسهیل می‌کند. از منابع دیگر اجسام کتونی موجود در مفاصل ملتهبه، می‌توان به نقش آنها در متابولیسم لنفوسیت‌ها در هنگام تصفیه ایمونولوژیکی اشاره نمود، که کاملاً بر اساس عمل اکسایشاین گونه اجسام می‌باشد. لذا، به خاطر اکسایش چربی‌ها در مفاصل، مقدار استیل کوآ تولیدی افزایش یافته و از طریق کتوژنز، باعث تولید اجسام کتونی می‌شود. این موضوع نیز، کاملاً منطبق بر نتایج تحقیق سال (۱۹۹۳) ناقتون و همکاران می‌باشد (۱۹).

## نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه بیماری روماتیسم زیر گروه‌های مختلفی داشته و همچنین پاسخ آنها به درمان یکسان نمی‌باشد (۲۰) و نیاز به روش‌های دقیق‌تری جهت تشخیص می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد با استفاده از الگوی به‌دست آمده از این مطالعه و به کمک مدل‌سازی شبکه‌های عصبی که دارای بعد سوم پیش‌بینی (prediction) است بتوان به تشخیص زود هنگام بیماری روماتیسم کمک کرد.

## References:

1. Yazici Y. Treatment of rheumatoid arthritis: we are getting there. Lancet 2009; 374: 178-80.
2. Jalili M, Shahram F, Ariaeian N, et al. Blood antoixidant enzyme levels in patient with Rheumatoid arthritis. TUMJ 2006; 64: 81-9.
3. McBride LJ, edithor. Textbook of Urinalysis and Body Fluids: A Clinical Approach. New York: Lippincott Williams & Wilkins: 1997.
4. Madsen RK, Lundstedt T,Gabrielsson J, et al, Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2011; 13: R19.
5. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, et al. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2005; 7: R949-58.
6. Spies CM, Straub RH, Buttgereit F. Energy metabolism and rheumatic diseases: from cell to organism. Arthritis Res Ther 2012; 14: 216.
7. Nordstrom A, Lewensohn R. Metabolomics: moving to the clinic. J Neuroimmune Pharmacol 2010; 5: 4-17.
8. Young SP, Nessim M, Falciani F, et al. Metabolomic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease. Mol Vis 2009; 15: 1210-7.
9. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, et al, Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. Ann Intern Med 2007; 146: 797-808.
10. Westwood OM, Nelson PN, Hay FC. Rheumatoid factors: what's new?. Rheumatology (Oxford) 2006; 45: 379-85.
11. Hull RG, Rennie JA, Eastmond CJ, et al. Nuclear magnetic resonance (NMR) tomographic imaging for popliteal cysts in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1984; 43: 56-9.
12. Lauridsen MB, Bliddal H, Christensen R, et al. 1H NMR spectroscopy-based interventional metabolic phenotyping: a cohort study of rheumatoid arthritis patients. J Proteome Res 2010; 9: 4545-53.
13. Viant MR, Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. Biochem Biophys Res Commun 2003; 310: 943-8.
14. Wishart DS, Quantitative metabolomics using NMR. Trends Analyt Chem 2008; 27: 228-37.
15. Masi AT. Incidence of rheumatoid arthritis: do the observed age-sex interaction patterns support a role of androgenic-anabolic steroid deficiency in its pathogenesis?. Br J Rheumatol 1994; 33: 697-9.
16. Ross DL, Neely AE, edithors. Textbook of Urinalysis and Body Fluids. New York: Appleton & Lange: 1982.
17. McGing P, O'Kelly R, edithors. The Biochemistry of Body Fluids. Ireland: ACBI: 2009.
18. Straub RH, Cutolo M, Buttgereit F, et al. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. J Intern Med, 2010. 267: 543-60.

Archive of SID


www.SID.ir

19.Naughton D, Whelan M, Smith EC, et al. An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. FEBS Lett 1993; 317: 135-8.

20.Van Wietmarschen HA, Dai W, van der Kooij AJ, et al. Characterization of rheumatoid arthritis subtypes using symptom profiles, clinical chemistry and metabolomics measurements. PLoS One 2012; 7: e44331.

Archive of SID


www.SID.ir

**ISMJ 2014; 17(2): 141-149**

***Orginal Article***

# H Nuclear magnetic resonance based metabonomics data analysis in rheumatoid arthritis

***M. Arjmand [1], A. Golshahi [1], A. Movahed [2,3*], A. Amini [4], Z. Akbari [1]***

*[1] Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, IRAN*
*[2] Research Center for Nuclear Medicine, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN*
*[3] Department of Biochemistry, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN*
*[4] Department of Rehumathology, School Of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN*

**(Received 8 Sep, 2012 Accepted 14 Mar, 2013)**

***Abstract***

**Background:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systematic inflammatory disorder that may affect many tissues and organs, but principally attacks synovial joints and it is a common rheumatic disease with many subtypes. Nuclear Magnetic resonance (1H NMR) spectrometers with high sensitivity, resolution and dynamic range has permitted the rapid, simultaneous investigation of complex mixtures of endogenous or exogenous components present in biological materials. Metabonomics is the systematic study of chemical finger print resulted from cell reactions and could be used as a new biomarker for early disease diagnosis. In the present investigation, we studied serum metabolic profile in rheumatoid arthritis (RA) in order to find out the metabolic finger print pattern of the disease.

**Materials and methods:** In our metabonomics study serum samples were collected from 16 patients with active RA, and from equal number of healthy subjects. They were evaluated during a one-year follow-up with the assessment of disease activity and 1H NMR spectroscopy of sera samples. In all the cases, the presence of active rheumatoid arthritis was shown by an increase in the T1 values of the synovium of the joints. We specified and classified all metabolites using PCA, PLSDA chemometrics methods. Chenomx (Trail Version) and ProMetab codes in Matlab software environments were used for our data analysis. Results were compared with the NMR metabolite data bank (www.metabolomics.ca). Anti-CCP, ANA and urea were also analyzed by ElISA and colorimetric methods respectively.

**Results:** The most changes identified in this study were in the biosynthesis pathways of steroid hormones, biotin, fatty acids, amino acids (Leucine, Valin and isoleucine) and also linoleic acid.

**Conclusion:** In rheumatoid arthritis disease, the activation of the immune system consumes larg amounts of energy. The main donor of free energy in cells is ATP, which is generated by both glycolysis and oxidative phosphorylation. Changes in amino acids and free fatty acids biosynthesis pathways confirm the high energy utilization. In this disease, the increase in free fatty acid metabolism leads to production of Acetyl CoA and ketone bodies. Since there are many diseases subtype in rheumatoid arthritis, more sensitive diagnostic method is required. The result of our investigation suggests that metabolome profiling method could be used as a new biomarker for early diagnosis of rheumatoid arthritis disease.

**Key words:** Metabonomics, rheumatoid arthritis, NMR spectroscopy, PCA, PLSDA, Pattern recognition, metabolic finger print

***Address for correspondence**: Department of Biochemistry, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN. e-mail:amovahed58@gmail,com.



Archive of SID
www.SID.ir