



## آنالیز داده‌های متابونومیکس به دست آمده از طیف‌سننجی تشخیص مغناطیسی هسته ۱H NMR جهت ارائه مسیرهای متابولیکی بیماری آرتربیت روماتوئید

محمد ارجمند<sup>۱</sup>، آتوسا گلشاهی<sup>۱</sup>، علی موحد<sup>۲،۳\*</sup>، اعظم امینی<sup>۴</sup>، زیبا اکبری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیوشیمی، انتیتو پاستور ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات پزشکی هسته‌ای، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

<sup>۳</sup> گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

<sup>۴</sup> گروه روماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

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

### چکیده

زمینه: آرتربیت روماتوئید از بیماری‌های اکسیانی بافت همبند می‌باشد و دارای زیر گروه‌های گوناگونی است که دریشترا اوقات علت اصلی آن را نمی‌توان مشخص نمود. هدف از این مطالعه، کاربرد اسپکتروسکوپی **1H NMR** جهت بررسی نمای متابولیکی و کسب اطلاعات بیوشیمیایی خون انسان سالم و مقایسه متابولوم آنها با سرم خون بیمار آرتربیت روماتوئیدی فعال می‌باشد. متابونومیکس بر پایه **NMR** برای آنالیز سریع نمونه‌های بیولوژیکی مناسب بوده و روش اسپکتروسکوپی **1H NMR** نسبت به روش‌های دیگر آنالیز ارجحیت دارد. آنالیز بیمار به کمک تشخیص مغناطیسی هسته به تشخیص زود هنگام بیماری نیز منجر می‌گردد. بدینهی 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 آرتربیت روماتوئید بهمنظور شناسائی یومارکر جدید و الگوی متابولیکی در این بیماران می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** به منظور بررسی متابولومیکس بیماران آرتربیت روماتوئید از سرم خون ۱۶ بیمار که در فاز فعال بیماری آرتربیت روماتوئید بودند و ۱۶ فرد سالم که از نظر جنس و سن مشابه گروه بیمار بودند استفاده شد. در تمام نمونه‌ها، حضور فاکتور روماتوئیدی آرتربیت از طریق افزایش در مقدار **T1** مایع سینوویال مفصلی نشان داده شده است. در این مطالعه به کمک روش‌های **PCA** و **PLSDA** و همچنین نرم افزارهای کنومکس و کد محاسباتی پرومتب در محیط متلب تمامی متابولیت‌های موجود در این بیماری را طبقه‌بندی شد و یافته‌ها با بانک داده‌های متابولیتی ([www.metabolonics.ca](http://www.metabolonics.ca)) **HNMR** مقایسه شد. همچنین آزمون‌های، (**Anti Nuclear ANA**) و **Anti CCP (Antibody)** و **Anti CCP (Anticyclic Citrullinated Peptide)**.

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

**نتیجه‌گیری:** در بیماری روماتیسم و بیماری‌های مزمن التهابی، فعال شدن دستگاه دفاعی باعث مصرف بیش از حد انرژی می‌گردد. **ATP** بهترین منع انرژی درون سلولی است و از مسیرهای گلیکولیزوفسفریلایسیون اکسیداتیو بدست می‌آید. تغییرات مشاهده شده در مسیر ستر و ورود به سیکل کریس اسیدهای آمینه والین و لوسین و همچنین ستر اسیدهای چرب آزاد نیز تأیید کننده نیاز بالای انرژی می‌باشد. در این افراد، افزایش ستر و کاتابولیسم اسیدهای چرب منجر به تولید استیل کوا و ستر اجسام کونی 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 به دست آمده از این مطالعه می‌توان به پیاش یومارکرهای جدید در تشخیص زود هنگام بیماری روماتیسم کمک نمود.

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

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

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 به منظور 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 به کارگیری پروتون اسپکتروسکوپی NMR وضعیت الگوی متابولیکی موجود در سرم خون بیماران آرتربیت 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 آرتربیت روماتوئید و گروه شاهد شامل ۱۶ انسان سالم، با محدوده سنی مشابه به صورت تصادفی از مراجعه کنندگان به مطب خصوصی مورد نظر در شهر بوشهر انتخاب شدند.

کلیه بیماران با تأثیر پژوهش متخصص و قبل از شروع به درمان انتخاب گردیده. از کلیه افراد پس از اخذ رضایت‌نامه مطابق با ضوابط مصوب وزارت بهداشت، خون‌گیری به عمل آمده و بلافضله 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 کترولی (گلد استاندارد) Anti CCP, ANA با روش الیزا (۹) و آزمایش اوره به روش کالری‌متري انجام گردید (۱۰). کلیه مواد مورد نیاز از شرکت‌های سیگما (Sigma) و مرک (Merck) تهیه شدند.

## مقدمه

آرتربیت روماتوئید بیماری سیستمیک مزمن و بهبود ناپذیری است، که عمدتاً بانوان را گرفتار می‌کند، و حدوداً ۱ درصد جمعیت دنیا به آن مبتلا می‌باشند (۱). در این بیماری مفاصل به طور قرینه درگیر شده و این امر منجر به تخریب غضروف و ایجاد ضایعات استخوانی می‌گردد (۲). تغییرات بیوشیمیائی در مایع سینوویال بیماران آرتربیت روماتوئیدی، با واکنش اکسیداسیون کامل اسید هیپوکلروس که به سیله میلوپراکسیداز از نوتروفیل موجود در حفره مفصلی ملتهب حاصل شده، انجام می‌پذیرد (۳). در آرتربیت روماتوئید، سرعت رسوب اریتروسیت‌ها افزایش می‌یابد و آزمون پروتئین فعال (CRP) مثبت می‌شود.

همچنین، آزمون سرم فاکتور روماتوئیدی (RF) در تشخیص آرتربیت روماتوئید نیز استفاده می‌شود، که در حدود ۸۰ درصد بیماران آرتربیت روماتوئیدی مثبت و در ۲۰ درصد بیماران منفی گزارش می‌شود. بنابراین، تشخیص سریع آرتربیت روماتوئید برای تعیین نوع درمان بیماران، امری مهم تلقی می‌گردد و یافتن آنتی‌بادی‌های ضدپیتیدهای حلقوی سیتروولینه (Anti-ccp) در این بیماری حکایت از شدت بیماری دارد (۴ و ۵) هر چند در تمامی بیماران این پیتید 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 به عنوان هدف درمانی مورد استفاده قرار گیرد (۶).

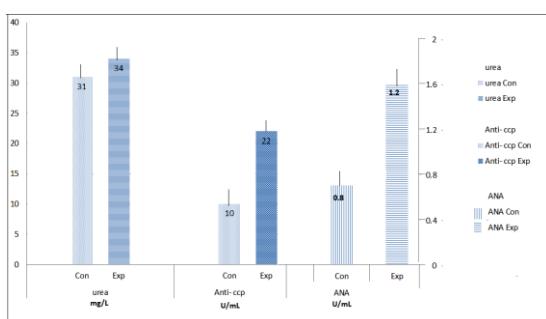
متabolومیکس<sup>۱</sup> علم نوظهور و نوینی است که به کمک آن می‌توان الگوی متابولوم یک سیستم را در یک واحد

<sup>۱</sup> Metabonomics

شیمیائی ۴/۵ تا ۵ حذف کرده و منحنی‌های ناخواسته موجود در محل‌های جابجایی شیمیائی ppm (۵/۴، ۲/۲)، (۵/۶/۵)، (۱/۱، ۲۵)، (۱۳)، (۳/۶۹۵، ۲۷۶۵) را به سبب طیف‌های مزاحم، حذف نمودیم. طیف‌هارا بر اساس ۰/۰۰۵ دسته‌بندی کرد (بینینگ) و بر اساس روش ترانسفورماتیون نرمالایز (normalize) شدند.

داده‌های به دست آمده را به کمک کد محاسباتی آنالیز اجزاء اصلی (PCA) و همچنین حداقل مریعات جزئی PLSDA مورد آنالیز قرار گرفت و داده‌ها بر اساس آزمون پارتی آماده سازی شدند. نقطه جابجایی شیمیائی متabolیت‌های متمازیز شده را جدا نمودیم و به کمک بانک اطلاعات متabolوم انسانی، متabolیت‌های غیرهمسان را در دو گروه آزمایش و نرمال مشخص نمودیم. همچنین به‌وسیله متabolیت‌های مشخص شده مسیرهای شیمیائی که متabolیت‌ها 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 ۱-۶).



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

### آماده‌سازی نمونه‌ها جهت طیف‌سنجدی

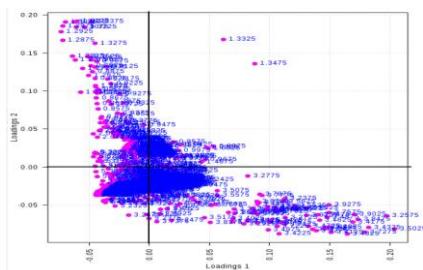
۶۰۰ میکرولیتر سرم از هر نمونه برداشته و در پروب مخصوص دستگاه NMR قرار داده شد. همچنین به‌منظور جلوگیری از تداخل منحنی‌های OH مربوط به آب، به هنگام طیف‌سنجدی <sup>1</sup>H NMR، آب نسبت ۱۰ درصد وزنی، D<sub>2</sub>O به هر کدام از نمونه‌ها افزوده شد و جهت ثبت نقطه صفر طیف، از تریمتیل-سیلیل-پروپونات-سدیم (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) آب دوتراه (D<sub>2</sub>O) به عنوان مرجع خارجی جابجایی شیمیائی به میزان ۵۰ میکرولیتر (۱ میلی‌مول/لیتر) استفاده گردید (۱۱).

### طیف‌سنجدی تشید مغناطیس هسته

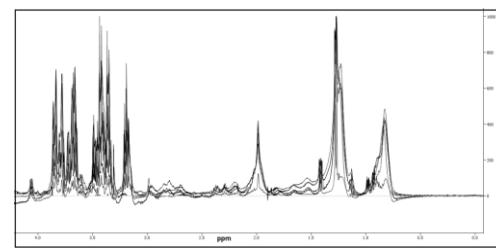
با توجه به وجود ماکرو مولکول‌های با وزن مولکولی بالا در کنار میکرو مولکول‌های سرم در این مطالعه از پروتکل 1D <sup>1</sup>H CPMG spin-echo NMR برای طیف‌سنجدی از دستگاه NMR بروکر ۵۰۰ MHZ استفاده گردید و پروتکل به صورت td<sup>30</sup>-[td-۱۸۰]-td<sup>۹۰</sup> تعریف شده و مقدار ۲۹۸ میلی‌ثانیه و n<sup>۱۰۰</sup> انتخاب گردید. دمای پروب در درجه کلوین تنظیم گردید و برای اشباع کردن منحنی آب به مدت ۳ ثانیه عمل اشباع انجام گردید (۱۲).

### آنالیز داده‌ها

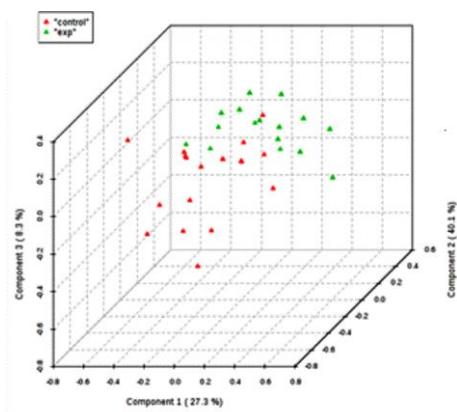
کد محاسباتی ProMetab، یک ابزار آنالیز داده‌های متabolومیکس حاصل از اسپکتروسکوپی تشید رزونانس هسته بوده که در محیط نرمافزار متلب (Matlab) مورد استفاده قرار می‌گیرد. متلب محیط محاسباتی است که قادر به محاسبات تحلیلی و عددی نظری رسم نمودار، تعریف و استفاده از متغیرها، ساخت و احضار توابع و غیره می‌باشد (۱۳). 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 جابجایی



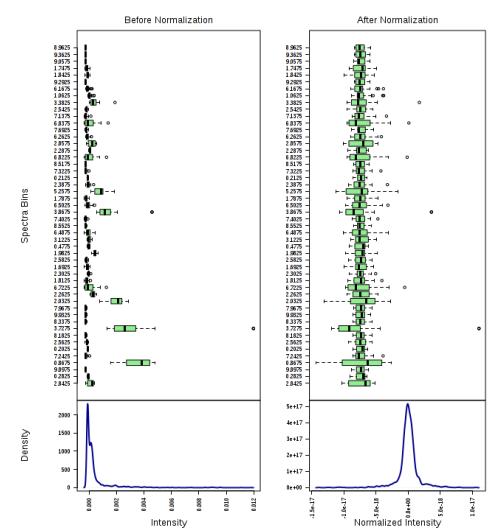
شکل ۵) جداسازی متابولیت‌ها بر اساس تست رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLSDA) و مقایسه loading 1 vs loading 2 (PLSDA)



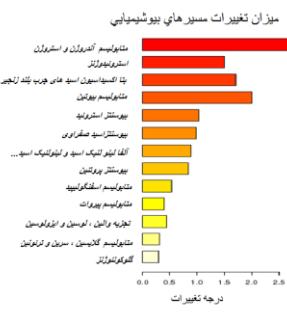
شکل ۲) طیف حاصله از نمونه‌های منطبق شده نرمال و گروه آزمایش طیف‌های منطبق شده نمونه بیمار و سالم، محور X جابجایی شیمیائی بر حسب ppm محور Y، شدت است.



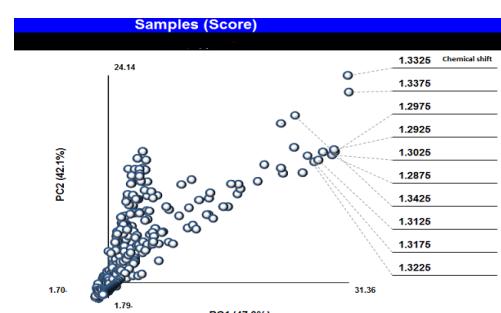
شکل ۶) جداسازی سه بعدی متابولیت‌ها (Scor plot) بر اساس تست رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLSDA)



شکل ۳) جابجایی شیمیائی داده‌ها قبل و بعد از نرمالیزاسیون بر اساس متند پارتو (Pareto)



شکل ۷) مسیرهای تغییریافته در بیماری روماتوئید آرتیت بر اساس وزن تغییرات (P)



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

متابونومیکس نشانگر تغیرات بسیاری در الگوی مسیرهای بیوشیمیائی مانند سترز هورمون‌های استروئیدی و مسیرهای متابولیسم بیوتین، بیوسترز اسیدهای چرب، سترز والین، لوسین و ایزولوسین، متابولیسم اسیدهای لینولئیک، متابولیسم تورین و هیپتورین، متابولیسم اسفینگوپلیپیدها، گلیکولیز و گلوکونوژنیز، متابولیسم پیروات، بیوسترز آمینوترانسفراز و متابولیزم پیروپیونات و همچنین تجزیه والین، لوسین و ایزولوسین می‌باشد.

## (جدول ۱) و (شکار)

شکل ۸) محل و درجه تغییرات مسیرها در بیماری روماتوئید آرتریت بر اساس  
چایگاه درون سلولی، ارگانها و مقدار (P)

## ما فته ها

یافته‌های این مطالعه نشانگر افزایش غلظت اوره در گروه بیمار می‌باشد، هر چند آنالیز داده‌های

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

تعداد متابولیتها در مسیر بیوشیمیائی	مسیر بیوشیمیائی	تعداد متابولیتهای تغییر باقته در مسیر بیوشیمیائی	میزان خطای اصلی (p value)	میزان خطای کاذب (p. value)	میزان خطای نوع اول (p. value)	میزان خطای نوع دوم کاذب منفی
۹۹	بیوسنتر هورمون های استروئیدی	۱۸	-۰/۰۳۷۵۷	۱	-۰/۰۴۱۳۴۵	-۰/۰۴۱۱۸۵
۱۱	ماتابولیسم بیوتین	۲	-۰/۰۴۱۳۴۵	۱	-۰/۰۴۱۳۴۵	-۰/۰۴۱۳۴۵
۴۹	بیوسنتر اسیدهای چرب	۴	-۰/۰۴۱۳۴۵	۱	-۰/۰۴۱۳۴۵	-۰/۰۴۱۳۴۵
۴۷	بیوسنتر اسیدهای صفرایی اولیه	۳	-۰/۰۴۱۱۸۵	۱	-۰/۰۴۱۱۸۵	-۰/۰۴۱۱۸۵
۲۷	بیوسنتر والین، لوسین، ایزو لوسین	۲	-۰/۰۴۱۰۴	۱	-۰/۰۴۱۰۴	-۰/۰۴۱۰۴
۱۵	ماتابولیسم لینولئیک اسید	۱	-۰/۰۳۷۵۸	۱	-۰/۰۳۷۵۸	-۰/۰۳۷۵۸
۲۰	ماتابولیسم تورزن و هیپوتورزن	۱	-۰/۰۴۱۲۸۹	۱	-۰/۰۴۱۲۸۹	-۰/۰۴۱۲۸۹
۲۵	ماتابولیسم اسفنگوکلیپیدها	۱	-۰/۰۴۹۷۳۶	۱	-۰/۰۴۹۷۳۶	-۰/۰۴۹۷۳۶
۳۱	گلیکوکوئیر یا گالو کونتوژنر	۱	-۰/۰۵۷۴۳۲	۱	-۰/۰۵۷۴۳۲	-۰/۰۵۷۴۳۲
۳۲	ماتابولیسم پیروات	۱	-۰/۰۵۸۵۹۶	۱	-۰/۰۵۸۵۹۶	-۰/۰۵۸۵۹۶
۷۵	بیوسنتر آمینو آسیل tRNA	۲	-۰/۰۶۰۸۴	۱	-۰/۰۶۰۸۴	-۰/۰۶۰۸۴
۳۵	ماتابولیسم پروپانوئات	۱	-۰/۰۶۱۹۰۵	۱	-۰/۰۶۱۹۰۵	-۰/۰۶۱۹۰۵
۴۰	والین، لوسین، ایزو لوسین تجزیه	۱	-۰/۰۶۶۸۵	۱	-۰/۰۶۶۸۵	-۰/۰۶۶۸۵
۴۸	ماتابولیسم فروکوتز و مانوز	۱	-۰/۰۷۳۴۷۹	۱	-۰/۰۷۳۴۷۹	-۰/۰۷۳۴۷۹
۴۸	ماتابولیسم کلاسین، سرین و ترۇنین	۱	-۰/۰۷۳۴۷۹	۱	-۰/۰۷۳۴۷۹	-۰/۰۷۳۴۷۹
۱۰۴	ماتابولیسم پورفیرین و کلروفیل II	۲	-۰/۰۷۷۱۲۱	۱	-۰/۰۷۷۱۲۱	-۰/۰۷۷۱۲۱
۶۲	ماتابولیسم آرشیدونیک اسید	۱	-۰/۰۸۲۰۸۴	۱	-۰/۰۸۲۰۸۴	-۰/۰۸۲۰۸۴
۷۷	ماتابولیسم آرژینین و پروولین	۱	-۰/۰۸۲۶۴۳	۱	-۰/۰۸۲۶۴۳	-۰/۰۸۲۶۴۳

شیوع بیماری روماتیسم رابطه مستقیمی با جنس و سن دارد. زنان بیشتر از مردان مستعد این بیماری هستند. رابطه هورمون‌های استروئیدی با بیماری می‌باشد. دفعی و عروقی و همچنین بیماری روماتیسم سیستم

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.

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 فرایند گلیکولیز در سیتوزول به پیروات و در میتوکندری پیروات را به آب و دی‌اکسیدکربن 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 بهسازی 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 هپاتوцит مشهود بوده و در ارگان‌هایی مانند شبکه آندوبلاسمیک 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 سنتز هورمون‌هایی 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 حلایت نسبتاً زیادی داشته، که این امر انتقال آن‌ها را، به محل‌های مورد نیاز

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 بیوستین آن به اسید آمینه لیزین چسبیده و به صورت 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 بهسازی 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 هم خوانی دارند. در بیماران روماتوئیدی و همچنین بیماری‌های مزمن التهابی میزان استفاده انرژی سلولی به صورت 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 آرتрит روماتوئیدی کاهش یافته ولی سطح لاكتات و اجسام کتونی افزایش می‌یابد (۱۶).

از سویی افزایش اسید اوریک و لاكتات دی‌هیدروژناز نیز در این گروه از بیماران می‌شود (۳). کاهش میزان گلوکز در مایع سینوویال از مارکرهای نشان‌دهنده

### 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 به دست 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.

تسهیل می‌کند. از منابع دیگر اجسام کتونی موجود در مفاصل ملتهبه، می‌توان به نقش آنها در متابولیسم لفوسیت‌ها 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 کتوژنر، باعث تولید اجسام کتونی می‌شود. این موضوع نیز، کاملاً منطبق بر نتایج تحقیق سال (۱۹۹۳) ناقتون و همکاران می‌باشد (۱۹).

### References:

- Yazici Y. Treatment of rheumatoid arthritis: we are getting there. *Lancet* 2009; 374: 178-80.
- Jalili M, Shahram F, Ariaeian N, et al. Blood antioxidant enzyme levels in patient with Rheumatoid arthritis. *TUMJ* 2006; 64: 81-9.
- McBride LJ, edithor. *Textbook of Urinalysis and Body Fluids: A Clinical Approach*. New York: Lippincott Williams & Wilkins: 1997.
- Madsen RK, Lundstedt T, Gabrielsson J, et al, Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R19.
- 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.
- Spies CM, Straub RH, Buttgerit F. Energy metabolism and rheumatic diseases: from cell to organism. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: 216.
- Nordstrom A, Lewensohn R. Metabolomics: moving to the clinic. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5: 4-17.
- Young SP, Nessim M, Falciani F, et al. Metabolomic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease. *Mol Vis* 2009; 15: 1210-7.
- 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.
- Westwood OM, Nelson PN, Hay FC. Rheumatoid factors: what's new?. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 379-85.
- 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.
- Lauridsen MB, Bliddal H, Christensen R, et al. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy-based interventional metabolic phenotyping: a cohort study of rheumatoid arthritis patients. *J Proteome Res* 2010; 9: 4545-53.
- Viant MR, Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 943-8.
- Wishart DS, Quantitative metabolomics using NMR. *Trends Analys Chem* 2008; 27: 228-37.
- 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.
- Ross DL, Neely AE, edithors. *Textbook of Urinalysis and Body Fluids*. New York: Appleton & Lange: 1982.
- McGing P, O'Kelly R, edithors. *The Biochemistry of Body Fluids*. Ireland: ACBI: 2009.
- Straub RH, Cutolo M, Buttgerit F, et al. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J Intern Med*, 2010. 267: 543-60.

- 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.

Orginal Article

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

**M. Arjmand<sup>1</sup>, A. Golshahi<sup>1</sup>, A. Movahed<sup>2,3\*</sup>, A. Amini<sup>4</sup>, Z. Akbari<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, IRAN

<sup>2</sup> Research Center for Nuclear Medicine, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

<sup>4</sup> 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](http://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

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>