

## کاربرد پروتئومیکس در شناسایی بیوماکرهای بیماری های گلومرولی



آنا میفور<sup>۱\*</sup>، مصطفی رضایی طاویرانی<sup>۱</sup>، اردشیر معیری<sup>۲</sup>، شهرام محمدپور<sup>۲</sup>

(۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

(۲) گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۱۶

### چکیده

بیماری های گلومرولی از جمله بیماری هایی هستند که روی فیلتراسیون نفرون ها در کلیه ها اثر می گذارند. در بسیاری از بیماران، نارسایی کلیوی منجر به بیماری های کلیوی مرحله نهایی (ESRD) می شود. درمان مناسب نیازمند شناخت عوامل ایجاد بیماری های گلومرولی است. اگر چه بیوپسی از کلیه راه تشخیص قطعی عامل بیماری است اما متاسفانه بیوپسی کلیه یک روش تهاجمی و بالقوه خطرناک است. بررسی ادرار از لحاظ وجود بیوماکرها می تواند جایگزین بیوپسی کلیه شود چرا که بسیار ساده تر، سالم تر و دقیق تر است و می تواند چندین بار برای پیگیری روند بیماری و بررسی پاسخ به درمان تکرار شود. در سال های اخیر به منظور پی بردن به مکانیسم های بیماری های کلیوی و آسیب گلومرولی و تمایز بین آن ها مطالعات پروتئومیکی خوبی انجام شده است که به نظر می رسد با بهبود روش های پروتئومیکی در آینده نتایج بهتری هم به دست خواهد آمد. در این مطالعه مروری به تفصیل در ارتباط با این موضوع بحث خواهد شد.

واژه های کلیدی: پروتئومیکس، کلیه، بیماری های گلومرولی، بیوماکر

\*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

**Email:** meyfour\_a@yahoo.com

## مقدمه

بیماری هایی که روی فیلتراسیون نفرون ها در کلیه ها اثر می گذارند بیماری های گلومرولی نامیده می شوند که یکی از عوامل اصلی ایجاد بیماری های کلیوی مزمن به شمار می روند. در بسیاری از بیماران، نارسایی کلیوی منجر به بیماری های کلیوی مرحله نهایی (ESRD)، دیالیز یا پیوند کلیه می شود. آسیب گلومرولی می تواند از یک بیماری کلیوی ابتدایی مثل گلومرولواسکلروز فوکال و سگمنتال (focal segmental glomerulosclerosis)، نفروپاتی غشایی (membranous nephropathy) و بیماری تغییر جزئی (minimal change disease) ایجاد شود. آسیب گلومرولی هم چنین می تواند از یک بیماری سیستمیک مثل دیابت، هپاتیت یا لوپس اریتماتوز سیستمیک (systemic lupus erythematosus) یک بیماری خودایمنی مزمن است که اندام های مختلفی مانند پوست، مفاصل و خون را درگیر می کند) ایجاد شود. در سراسر جهان عوامل ایجاد کننده ESRD همان بیماری های گلومرولی هستند. هزینه پزشکی برای بیماران ESRD در سال ۲۰۰۱ حدود ۲۲/۸ میلیون دلار بوده است که بخش زیادی از آن مربوط به بیماران دیابتی است و این هزینه ها درد و رنج ناشی از این بیماری، هزینه های انسانی و مرگ و میر ناشی از آن را نشان نمی دهد، (۱). فقدان بیومارکرها برای تشخیص و پیشگویی، مانع اصلی برای بهبود روش های درمان این بیماران می باشد. درمان مناسب نیازمند شناخت عوامل ایجاد بیماری های گلومرولی است. بیوپسی از کلیه، راه تشخیص قطعی عامل بیماری است. اما متأسفانه بیوپسی کلیه یک روش تهاجمی و بالقوه خطرناک است و دارای محدودیت هایی هم چون عدم امکان انجام بیوپسی در افراد چاق یا گرفتن بیوپسی به صورت متوالی، هزینه های بالا و عدم ارائه تصویر کامل از بیماری می باشد، (۲،۳). پس تست تشخیصی دقیق و غیرتهاجمی می تواند عواقب ناشی از این بیماری را کاهش دهد. بررسی ادرار از لحاظ وجود بیومارکرها می تواند جایگزین بیوپسی لیه شود چرا که بسیار ساده تر، سالم تر و دقیق تر است و می تواند چندین بار برای پیگیری روند بیماری و بررسی پاسخ به درمان تکرار شود. در سال های اخیر به منظور پی بردن به مکانیسم های بیماری های کلیوی و آسیب گلومرولی، تمایز بین آن ها مطالعات خوبی انجام شده است که به نظر می رسد با بهبود روش های پروتئومیکس در آینده نتایج بهتری هم به دست خواهد آمد.

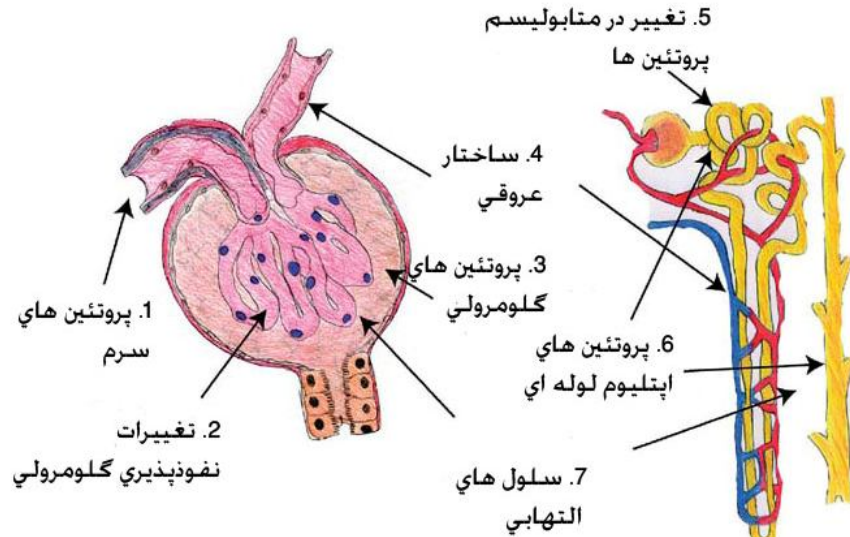
در ادامه به تفصیل در ارتباط با این موضوع بحث خواهد شد.

## ادوار منبعی از بیومارکهای پروتئینی

پروتئین ها در ادرار می توانند از چندین منبع در نفرون ایجا شده باشند. علاوه بر این، آن ها می توانند از طریق فرایندهای فیزیولوژی و پاتوفیزیولوژی تغییر پیدا کنند. شکل شماره ۱ هشت منبع بالقوه برای پروتئین های ادرار را نشان می دهد که عبارتند از: ۱- پروتئین ها در سرم که به صورت طبیعی فیلتر می شوند، ۲- تغییرات در نفوذپذیری گلومرولی می تواند غلظت پروتئین های سرم را که در حالت عادی فیلتر نمی شوند افزایش دهد، (۴). تغییرات در نواحی مختلف سد نفوذپذیری گلومرولی می تواند منجر به تغییر در الگوی پروتئینی ادرار شود که هر کدام مختص به یک بیماری باشد، (۵-۱۰). ۳- پروتئین ها می توانند در گلومرول به صورت طبیعی یا در پاسخ به یک آسیب یا تحریک کننده ایجاد شوند، (۱۱). ۴- پروتئین ها می توانند از یکی از ساختارهای عروقی مرتبط با نفرون مثل مویرگ آوران یا شریان مستقیم کلیه نشأت گرفته باشند. ۵- تغییرات در متابولیسم پروتئین ها؛ پروتئین های با وزن مولکولی کم (کمتر از ۴۰kDa) معمولاً فیلتر می شوند ولی اکثر آن ها متابولیزه می شوند و دوباره در لوله نزدیک (proximal) جذب می شوند. زمانی که لوله های کلیوی آسیب می بیند، متابولیسم تغییر می کند و غلظت پروتئین های با وزن مولکولی کم افزایش می یابد، (۱۲،۱۳). ۶- پروتئین ها می توانند از اپیتلیوم لوله ای وارد ادرار شوند، (۱۴،۱۵-۱۷). ۷- سلول های التهابی مهاجم در بیماری های خود ایمنی یا دیگر بیماری ها می توانند باعث ایجاد پروتئین هایی در ادرار شوند. این پروتئین ها می توانند اطلاعاتی را در مورد پاسخ میزبان به آسیب ارائه دهند و ۸- پروتئین ها می توانند از دستگاه ادرای تحتانی تر منشا بگیرند. مطالعاتی که روی اندازه گیری پروتئین های ادراری به عنوان مارکری برای سرطان های دستگاه ادراری تحتانی است رو به افزایش است، (۱۸،۱۹). این منابع چندگانه برای ایجاد و حذف پروتئین در ادرار، مسئول ایجاد تفاوت های زیستی فراوانی هستند اما می توانند یک فرصت تشخیصی بسیار خوب را فراهم کنند. از فرایندهای پاتوفیزیولوژیکی که خصوصیات مشابهی دارند می توان انتظار داشت که تغییرات مشابهی در پروتئین های ادرار ایجاد کنند. در مورد بیماری های گلومرولی تغییر در نفوذپذیری سد فیلتراسیون گلومرولی می تواند فرصت مناسبی برای تعیین تفاوت های

می توانند با بیماری های گلومرولی مرتبط باشند.

پروتئین های ادرار از نظر سایز و بار باشد و این تفاوت ها



8. دستگاه ختانی ادرار

شکل شماره ۱. مکان هایی که پروتئین های ادرار از آن ها نشأت گرفته اند. پروتئین های ادرار می توانند از مکان های مختلفی در طول نفرون و طی پروسیسه های فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی ایجاد شوند.

#### پروتئومیکس ادرار

بیشتر بود، (۲۸). یک فن آوری جالب توجه توسط کنپر و همکاران انجام شد که در آن ساختارهای ادراری با چگالی کم به نام اگزوزوم تخلیص شدند. این ساختارها حاوی پروتئین های غشایی چندین ناحیه کلیه از جمله گلومرول می باشند، (۱۱،۲۹). با دسترسی به این وزیکل ها یک منبع بسیار غنی اطلاعاتی از نواحی خاص کلیه در اختیار قرار می گیرد. اخیراً یک کاندیدای بیومارکر برای آسیب حاد کلیه به نام فتوئین A- (fetuin-A) با آنالیز ژل الکتروفورز دو بعدی اگزوزوم ها مورد شناسایی قرار گرفته است، (۳۰). مطالعه اگزوزوم ها هنوز برای شناسایی بیومارکرها در بیماری گلومرولی مورد استفاده قرار نگرفته است. در واقع مطالعات نسبتاً کمی روی پروتئوم ادراری در بیماری گلومرولی یا دیگر بیماری های کلیوی انجام شده است. استار و همکاران، (۳۱)، ۴ مرحله کشف بیومارکر را شرح دادند: کشف، توسعه ارزیابی و تایید اولیه، تعیین کاربرد کلینیکی و توسعه محصول. کشف بیومارکر برای بیماری های کلیوی هنوز در مراحل اولیه است. در کمتر از ۲۰ مطالعه برای یافتن مارکرها بیماری های گلومرولی در انسان از تکنیک های پروتئومیکس استفاده شده است که شامل مطالعه روی بیماری دیابت، لوپوس و دیگر بیماری های گلومرولونفریت می باشند. در آن ها از تکنیک CE-

با این استدلال که بیومارکرها می توانند در ادرار حضور داشته باشند احتمال تشخیص بیماری های گلومرولی یا تشخیص زود هنگام آن ها وجود دارد. تکنیک های پروتئومیکس به صورت گسترده برای شناسایی بسیاری از پروتئین های موجود در ادرار مورد استفاده قرار گرفته اند. پروتئین های ادرار با تکنیک الکتروفورز دو بعدی، (۲۳-) LC-MS، (۲۴، ۱۵)، و طیف سنجی جرمی (۲۰، ۱۷)، و طیف سنجی جرمی (۲۴، ۱۵)، شناسایی شده اند. تکنیک الکتروفورز موئین (capillary electrophoresis) همراه با طیف سنجی جرمی (CE-MS) یک فن آوری بسیار خوب برای کشف بیومارکرهاست. این فن آوری برای تولید الگوهای از پروتئین ها با وزن مولکولی کم و پپتیدها در ادرار بر اساس دو ویژگی حرکت (توسط CE) و جرم (توسط MS) به کار می رود، (۲۵). روش (Surface Enhanced SELDI (Laser Desorption/Ionization) هم برای شناسایی الگوهای پروتئینی مرتبط با رد حاد پیوند کلیه (acute rejection) مورد استفاده قرار گرفته است، (۲۶، ۲۷). تکنیک های SELDI و CE-MS در یک گزارش مورد مقایسه قرار گرفته اند و در آن قدرت تفکیک پیک ها به علاوه الگوی پلی پپتیدی مشاهده شده با CE-MS بسیار

MS، الکتروفورز دو بعدی و SELDI استفاده شده است. در بسیاری از مطالعات، این سوال مطرح بود که آیا تفاوت بیان در پروتئین های ادراری بین افراد سالم و بیمار با سندروم نفروتیک وجود دارد؟ در اکثر مطالعات انجام شده نتوانستند پروتئین مشخصی را پیدا کنند که بتواند بین مراحل مختلف بیماری تمایز قائل شود. در ادامه به تفصیل در مورد بررسی پروتئومیکی این بیماری ها بحث خواهد شد.

#### نفریپاتی دیابتی

یکی از سوالات کلیدی مربوط به بیماران دیابتی این است که بیماری در کدام بیماران پیشرفت خواهد کرد و تبدیل به ESRD می شود. شناسایی مارکرهای پروتئینی که بتوانند پیشرفت نفریپاتی دیابتی را پیش بینی کنند می تواند در درمان کمک کند. مارکرها در نفریپاتی دیابتی می تواند برای نوع دیابت اختصاصی باشد. میر و همکاران که از تکنیک CE-MS برای آنالیز ادرار ۴۴ بیمار با دیابت نوع ۱ در طی ۵ سال یا بیشتر استفاده کردند، (۳۲)، بیماران به یکی از ۴ گروه زیر طبقه بندی شدند: افراد سالم، بیماران با دیابت نرمال آلبومینوری، میکروآلبومینوری و میکروآلبومینوری. دو پلی پپتید با اختلاف جرمی کمتر از ۰/۰۵ درصد و اختلاف زمان شویی کمتر از ۵ دقیقه در CE از هم تشخیص داده شد. الگوهای پلی پپتیدی که بین افراد سالم و بیماران دیابتی متمایز بودند مشخص شدند. علاوه بر این ۸۸ پلی پپتید یافت شد که در گروه دیابتی ها میان آن هایی که میکروآلبومینوری داشتند و افراد با آلبومینوری نرمال تفاوت داشتند. نویسندگان این مطالعه پیشنهاد کردند که این تکنیک می تواند برای شناسایی بیماران با احتمال بالای پیشرفت نفریپاتی دیابتی مورد استفاده قرار گیرد اما به خاطر این که الگوی پپتیدها با میکروآلبومینوری ارتباط دارد، تکنیک فوق فایده ای بیشتر از یک تست ساده کلینیکی میکروآلبومینوری ندارد. اگر الگوی پلی پپتیدی زودتر اتفاق می افتاد یا برای پیشرفت بیماری کلیوی دیابت اختصاصی تر بود، الگوی پلی پپتیدی می توانست منجر به تست تشخیصی بسیار مفیدتری شود. به دلیل این که بررسی در مجموعه دومی از بیماران تکرار نشد، ارتباط الگوی پلی پپتیدی با میکروآلبومینوری هنوز تایید نشده است. در مطالعه مشابهی که روی بیماران با تیپ ۲ دیابت انجام شد، میسچک و همکاران با استفاده از تکنیک CE-MS الگوهای پلی پپتیدی ۱۱۲ بیمار دیابتی با درجات مختلف پروتئینوری و ۳۹ فرد سالم را مورد مقایسه قرار دادند، (۳۳). یک الگوی پلی پپتیدی در بیماران با

درجات بالای پروتئینوری دیده شد که محققین این الگو را نشان تخریب کلیوی نامیدند. در این مطالعه ۳ پلی پپتید با لکه گذاری فراکشن CE روی پلیت MALDI و انجام طیف سنجی جرمی متوالی تعیین هویت شدند. هر کدام بخشی از پروتئین های 3 insulin like peptide، ارومودولین (uromodulin) و آلبومین بودند. در واقع این مطالعه یک ارتباط بین الگو و آلبومینوری را توصیف می کند. روسینگ و همکاران از تکنیک CE-MS برای بررسی بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ دارای آلبومینوری نرمال، میکروآلبومینوری و ماکروآلبومینوری استفاده کردند، (۳۴). گروه آلبومینوری نرمال به بیماران با و بدون نفریپاتی دیابتی تقسیم شدند. بر خلاف مطالعه میسچک و همکاران، (۳۳)، هیچ تفاوتی بین بیماران نرمال آلبومینوری و میکروآلبومینوری که رتیپاتی داشتند یا نداشتند مشاهده نشد. اگر چه بین الگوهای بیماران ماکروآلبومینوری و نرمال آلبومینوری تفاوت دیده شد. در این مطالعه ۱۱۳ پلی پپتید دارای تغییر بیان را به عنوان مارکرها آسیب دیابتی کلیه معرفی شد. درمان با مهار کننده گیرنده انجیوتنسن (angiotensin)، کاندزارتان (candesartan)، بیان ۱۵ پلی پپتید از ۱۱۳ پلی پپتید را تغییر داد. روسینگ تنها جرم ۱۱ پپتید مرتبط با آسیب کلیه دیابتی را اعلام کرد که با تکنیک طیف سنجی جرمی متوالی تعیین هویت شده بودند و لیستی از زمان شویی جرم ۱۵ پپتید را معرفی کرد که بیانشان به دنبال درمان با کاندزارتان تغییر کرده بود. هم پوشانی کمی بین پلی پپتیدهای تشخیصی دو مطالعه وجود دارد. تنها سه مورد از آن ها مشترک بودند که به صورت مشابه هم دارای تغییر بیان بودند.

در مطالعه ای پروتئین های ادرار بیماران دیابتی تیپ ۲ دارای میکروآلبومینوری با افراد سالم به کمک تکنیک الکتروفورز دو بعدی مورد مقایسه قرار گرفتند، (۳۵). ۴ پروتئین اصلی به علاوه آلبومین در بیماران میکروآلبومینوری مشاهده شدند: zink alpha-2 glycoprotein، alpha-1 acid glycoprotein، alpha-1 microglobulin و IgG. ابتدا در ادرار ۳ بیمار، وجود ۳ پروتئین zink alpha-2 glycoprotein، alpha-1 acid glycoprotein، alpha-1 microglobulin قبل از حضور میکروآلبومینوری شناسایی شد. این مطالعات اثبات می کنند که پروتئین های دیگری به جز آلبومین در ادرار بیماران دیابتی وجود دارد و در بعضی موارد پروتئین ها حتی قبل از میکروآلبومینوری در ادرار افراد ظاهر می شوند. به نظر نمی رسد که این پروتئین

ها مارکرهای اختصاصی برای اوایل نفروپاتی دیابتی باشند زیرا این مارکرها در دیگر بیماری ها هم دیده شده اند اما ممکن است که اهمیت پیش آگهی داشته باشند. شارما و همکاران بیماران نفروپاتی دیابتی تیپ ۱ و ۲ را با استفاده از الکتروفورز دو بعدی مورد مطالعه قرار دادند، (۳۶). یکی از لکه های پروتئینی به نام  $\alpha-1$  - آنتی تریپسین ۱۹ بار در بیماران دیابتی دارای افزایش بیان بود. یافته های به دست آمده برای  $\alpha-1$  - آنتی تریپسین در مجموعه جداگانه ای که شامل ۱۹ بیمار نفروپاتی دیابتی و ۲۰ نمونه کنترل بود با روش ELISA مورد تایید قرار گرفت. محققین این مطالعه نشان دادند که  $\alpha-1$  - آنتی تریپسین می تواند به عنوان مارکری برای نفروپاتی دیابتی پیشرونده باشد که مطالعات آینده باید این فرضیات را تایید کنند. مطالعات روی بیماران دیابتی، پروتئین های پلاسما یا بخشی از پروتئین های پلاسما را به عنوان کاندیدای مارکر شناسایی کرده اند. این که آن بخش از پروتئین در پلاسما ایجاد می شود و فیلتر می شود یا نتیجه تکه تکه شدن پروتئین ها در نفرون است هنوز یک سوال بدون جواب است چرا که یافته های اخیر نشان می دهند که تکه های آلبومین و  $\alpha-1$  - آنتی تریپسین را می توان هم در ادرار و هم در پلاسما یافت. (۳۷)

#### نفريت لوپوس

محققان برای شناسایی مارکرهای پروتئینی جهت تشخیص بیماری گلوامرولی نفريت لوپوس و تمایز بین کلاس های این بیماری از روش ها و آنالیزهای پروتئومیکسی استفاده کرده اند. نفريت لوپوس یک بیماری شدید و نسبتاً رایج در بین افراد دارای بیماری های خود ایمنی systemic lupus erythematosus (SLE) است. ۶ کلاس نفريت علاوه بر سطوح درجه بندی شده برای فرم فعال و مزمن بیماری وجود دارد که با بیوپسی از کلیه می تواند مشخص شود. شناسایی بیومارکرهایی که نشان دهنده پارامترهای بیماری بدون بیوپسی باشند می توانند درمان سریع تر و مناسب تر را تسهیل کنند. موسلی و همکاران از تکنیک SELDI برای مرتبط ساختن پیک های پپتیدی در دو جرم با فعالیت لوپوس استفاده کردند، (۳۸). در این مطالعه نمونه های ادراری از ۲۶ بیمار با لوپوس فعال و ۴۹ بیمار با لوپوس غیرفعال جمع آوری شدند. بررسی های مقایسه ای نشان داد که دو پپتید با وزن ۳۳۴۰ و ۳۹۸۰ با طبقه بندی بیماری به دو صورت فعال و غیرفعال مرتبطند. میزان طبقه بندی صحیح برای هر دو فرم فعال و غیرفعال بیماری ۹۳ درصد بود. در این مطالعه هویت مارکرهای پپتیدی مشخص نشد.

تمایز بین کلاس های نفريت لوپوس مشکل مهمی است. معمولاً اکثر بیماران یک تک بیوپسی کلیه می شوند و به طور مرتب هم پی گیری نمی کنند و از آن جا که کلاس نفريت یک بیمار ممکن است با گذشت زمان تغییر کند احتمال این که درمان مناسب نباشد وجود دارد. از تکنیک الکتروفورز دو بعدی برای شناسایی مجموعه ای مارکر استفاده کردند تا طبقه بندی بیماری لوپوس و ضریب مزمن بودن آن را از نظر بافتی تخمین بزنند، (۳۹). ادرار ۲۰ بیمار در زمان بیوپسی کلیه جمع آوری شد. پروتئین های ادرار توسط الکتروفورز دو بعدی جداسازی شدند. داده های فراوانی با شبکه های عصبی هوشمند برای تعریف الگوریتم که کلاس، فعالیت و مزمن بودن بیماری را پیشگویی کند مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی های انجام شده، کلاس III و IV بیماری را با سطح زیر منحنی ۰/۹۳ و ۰/۹۵ به خوبی و کلاس V بیماری با سطح زیر منحنی کمتر یعنی ۰/۸۵ پیشگویی کرد. هم چنین بررسی ها مزمن بودن بیماری را با ضریب همبستگی ۰/۸۷ تخمین زد. پروتئین های تعیین هویت شده دو شکل باردار از zink alpha-2 glycoprotein، alpha-1 acid glycoprotein، alpha-2 glycoprotein و زنجیره سبک IgG کاپا بودند. به دلیل این که طبقه بندی بیماری نفريت لوپوس به مقدار زیادی بر اساس مکان آناتومی و نوع آسیب درون سد نفوذپذیری گلوامرولی است، کلاس های مختلف نفريت می توانند الگوهای متفاوتی از تغییرات بیان پروتئین ها در ادرار را ایجاد کنند. شناسایی پروتئین های مشابه دارای با تعداد متفاوت بار به عنوان بیومارکر نشان می دهد که تغییرات منحصر به فردی برای سد نفوذپذیری گلوامرولی در کلاس های بیماری اتفاق می افتد.

#### بیماری های گلوامرولی

برای شناسایی الگوهای پروتئینی مربوط به بیماری های گلوامرولی، مدل های حیوانی می توانند بسیار مفید باشند. کوتلر و همکاران برای بررسی پروتئین های ادراری توسط الکتروفورز دو بعدی از مدلی استفاده کردند که منعکس کننده بیماری تغییرناپذیر بود، (۴۰). نگی و همکاران مارکرهای ادراری را در مدل نفريت غیرفعال Heyman بررسی کردند، (۴۱). این مدل های حیوانی با شناسایی پروتئین ها در ادرار یا نشان دادن تغییرات ایجاد شده در پارانشیم کلیه که ممکن است تغییرات در ادرار هم دیده شوند می توانند در مطالعات آینده روی انسان مثرتر باشند.

قرار دادند،(۴۷). محدودیت این مطالعه وجود یک بیمار برای هر بیماری بود. الگوی متفاوتی از پروتئینوری در هر بیمار دیده شد و الگوی تشخیصی یافت نشد. پارک و همکاران برای شناسایی الگوی پروتئینی بیماری نفروپاتی IgA از الکتروفورز دو بعدی استفاده کردند،(۴۸). هدف از انجام این مطالعه بیشتر ایجاد نقشه مرجع برای پروتئین های موجود در بیماری نفروپاتی IgA بود. Thongboonkerd و همکاران با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی، یک بررسی اولیه روی بیان پروتئینی افراد سالم و ۳ بیماری گلومرولی نفریت لوپوس، نفروپاتی دیابتی و FSGS انجام دادند،(۴۹). در افراد سالم در مقایسه با گروه های بیمار آلومین، ترانسفرین و  $\alpha_1$ -آنتی تریپسین دارای کاهش بیان و کینینوژن(kininogen) و ۳-فوربولین(-phobolin) 3 دارای افزایش بیان بودند. در بیماران FSGS، یک پروتئین ناشناخته و یک فرم از هورمون رشد در مقایسه با سه گروه دیگر دارای افزایش بیان بودند. نویسندگان این مطالعه پروتئین تشخیصی پیدا نکردند و نتایج هم در مجموعه جدیدی از بیماران مورد تایید قرار نگرفت. اخیراً مطالعات کاملی برای شناسایی مارکرهایی که قابلیت تمایز ۴ بیماری مختلف گلومرولی را داشته باشند طراحی شده اند،(۵۰). ۳۲ بیمار با ۴ بیماری گلومرولی نفریت لوپوس، نفروپاتی غشایی، نفروپاتی دیابتی و FSGS مورد بررسی قرار گرفتند. پروتئین های ادرار با الکتروفورز دو بعدی جدا شدند. فراوانی پروتئین ها بین گروه ها مورد مقایسه قرار گرفت اما مطابق با یافته های مطالعات قبلی، هیچ پروتئین خاصی برای تمایز بیماری ها از هم پیدا نشد. در این مطالعه از ابزار آموزش ماشین، شبکه های عصبی مصنوعی برای بررسی الگوها استفاده شد. حساسیت سنجش بیماران در تست برای ۴ بیمار ۸۶-۷۵ درصد و اختصاصیت ۹۲-۶۷ درصد تعیین شد. این مطالعه بر خلاف مطالعات قبلی، مجموعه مستقلی از بیماران را استفاده و تلاش کرده که بیماری را از ۴ بیماری احتمالی پیشگویی کند. تست انجام شده در زمان پیشگویی لوپوس در همه موارد(۴/۴)، در زمان پیشگویی FSGS در ۷۵ درصد موارد و پیشگویی نفروپاتی دیابتی در ۶۷ درصد موارد صحیح بود. در زمان پیشگویی نفروپاتی غشایی تست تنها در ۲۰ درصد موارد(۱/۵) صحیح بود. پروتئین هایی که برای الگوریتم مهم تر بودند مشخص شده بودند. همه پروتئین های تعیین هویت شده، پروتئین های پلاسما بودند و همه آن ها روی ژل به فرم های با بارهای مختلف وجود داشتند. مارکرهای پروتئینی که می توانستند بین بیماری ها تمایز ایجاد کنند و

ویتک و همکاران برای شناسایی مارکرها در بیماری تغییر ناچیز، نفروپاتی غشایی و FSGS از روش CE-MS استفاده کردند،(۴۲). آنالیز داده ها با استفاده از دو تکنیک supervised learning انجام شد: random forest و analysis support vector machine. بررسی های اولیه نتوانست تمایزی بین دو بیماری FSGS و MCD قائل شوند لذا این دو بیماری در یک گروه قرار گرفتند. بعد از تایید، نرخ طبقه بندی صحیح برای افراد سالم =  $93/8$  درصد،  $MCD/FSGS = 71/4$  درصد و  $MN = 92/9$  درصد بود. تمایز بین افراد سالم و افراد مبتلا به بیماری گلومرولی یک مشکل نیست و یافته اصلی این مطالعه الگویی از پپتیدهاست که می تواند بیماران مبتلا به نفروپاتی غشایی را از MCD/FSGS تشخیص دهد. هابیتز و همکاران با استفاده از تکنیک CE-MS و support vector machine، پلی پپتیدهای ادراری را در ۴۵ بیمار مبتلا به نفروپاتی IgA با افراد سالم و ۱۳ بیمار نفروپاتی غشایی را با هم مقایسه کردند،(۴۳). با استفاده از الگوی پلی پپتیدها، نفروپاتی IgA با حساسیت ۱۰۰ درصد از افراد سالم و با حساسیت ۷۷ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد از افراد مبتلا نفروپاتی غشایی تشخیص داده شد. ویتک و همکاران برای شناسایی مجموعه ای از مارکرهای بیماری های گلومرولی در ادرار از تکنیک CE-MS استفاده کردند،(۴۴). در این مطالعه الگوی پلی پپتیدهای مربوط به گروه بزرگی از نمونه ها شامل افراد سالم(۳۰۰ نمونه)، افراد مبتلا به نفروپاتی IgA(۱۰۰ نفر)، افراد مبتلا به FSGS(۳۰ نمونه)، نفروپاتی غشایی(۵۰ نمونه)، بیماری تغییر ناچیز(۱۰۰ نفر) و نفروپاتی دیابتی(۲۵۰ نفر) مورد مطالعه قرار گرفت. اما اختصاصیت، حساسیت و توانایی الگوها در تمایز بین گروه ها در مجموعه جدیدی از بیماران مورد بررسی قرار نگرفت. مطالعه جالبی انجام شده است که توانایی های روش CE-MS را به عنوان یک روش مناسب برای کشف بیومارکر به خوبی نشان می دهد. محققین از این تکنیک برای شناسایی بیومارکرهای ادراری در یک بیماری لگنی مادرزادی استفاده کردند،(۴۵). مطالعه مشابهی برای شناسایی مارکرهای ادراری و تایید آن ها در سرطان اورتلیال(urothelial) انجام شد،(۴۶). تایید بیومارکرهای موجود در ادرار در بیماری های دیگر با استفاده از تکنیک CE-MS نوید بخش امکان تأییدهای مشابه در بیماری های گلومرولی است. لافیت و همکاران الگوی پروتئین های ادراری تهیه شده توسط الکتروفورز دو بعدی را در افراد نرمال با ۴ بیمار مبتلا به بیماری های کلیوی مورد مقایسه

شناخته شده بسیار حائز اهمیت است. مشابه با سایر موارد کشف بیومارکر، در این زمینه هم الگوی مارکرهای پروتئینی بیشتر از تک یا چند پروتئین برای تمایز بین بیماری‌ها لازم است. شناسایی پروتئین‌های این الگوها نیازمند ابزارهای اطلاعاتی و الگوریتم‌های پیچیده است. در مطالعاتی که کاندیدهای بیومارکری تعیین هويت شده اند مشخص شده که آن‌ها از پروتئین‌های پلاسما یا بخشی از آن هستند. پس تفاوت در فیلتراسیون پروتئین‌ها از سد نفوذپذیری گلومرولی در توانایی تشخیص یا پیشگویی بیماری توسط بیومارکر حائز اهمیت است. در آینده اختراع ابزارهایی که بتوانند پروتئین‌ها و اشکال باردار آن‌ها را در مجموعه‌های بالینی اندازه بگیرند برای تأیید بیومارکرها و معرفی آن‌ها جهت استفاده‌های بالینی مورد نیاز است. ایجاد روش‌هایی که بتوانند بیماری را تشخیص دهند، بیماری و پاسخ به درمان را پیشگویی کنند و برای پیگیری پاسخ به درمان استفاده شوند می‌توانند از بیماری‌های گلومرولی جلوگیری کنند یا روند پیشرفت آن را کند کنند.

#### References

- 1-Bethesda MD. Annual data report: atlas of end-stage renal disease in the united states. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2004.
- 2-Eiro M, Katoh T, Watanabe T. Risk factors for bleeding complications in percutaneous renal biopsy. Clin Exper Nephrol 2005;9:40-5.
- 3-Stiles KP, Yuan CM, Chung EM, Lyon RD, Lane JD, Abbott KC. Renal biopsy in high-risk patients with medical diseases of the kidney. Am J kidney Dis 2000;36:419-33.
- 4-Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. The New England journal of medicine 1978;298:826-33.
- 5-Brewer DB. Renal clearances of dextrans of varying molecular weights. Proc Roy Soc Med 1951;44:561-3.
- 6-Wallenius G. [Renal clearance of dextran as a measure of glomerular permeability]. Acta Soc Med Upsal Suppl 1954;59:1-91.
- 7-Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. Am J Physiol 1978; 234:F455-60.

گلیکوزیله (قنددار) شده بودند شامل  $\alpha$ -1-آنتی تریپسین،  $\alpha$ -1-میکروگلوبولین، آلومین، ترانسفرین، هاپتوگلوبین و zinc alpha-2 glycoprotein بودند. توانایی پروتئین‌ها با سایز و بار مختلف در پیشگویی بیماری‌ها نشان می‌دهد که تفاوت سدهای نفوذپذیری بار و سایز گلومرولی مختص به نوع بیماری است. از آن جا که بیماری‌های گلومرولی به طرق مختلف (از نظر گلومرولی و پاتوفیزیولوژی) روی GBM اثر می‌گذارند. پس تفاوت در پروتئین‌های ادراری می‌تواند منعکس کننده مکانیسم‌های مختلف این بیماری‌ها باشد.

#### بحث و نتیجه گیری

شناسایی بیومارکر گلومرولی در ادرار با استفاده از ابزارهای پروتئومیکس در مراحل اولیه است اما به سرعت در حال پیشرفت است. اکثر مطالعات انجام شده در این حیطه مربوط به سال‌های اخیر است. مطالعات بسیار کمی جهت تأیید یافته‌ها در مجموعه‌های جدیدی از بیماران انجام شده است. این مرحله برای تعیین معنادار بودن مارکرهای

- 8-Caulfield JP, Farquhar MG. The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane as the primary filtration barrier. J Cell boil 1974;63:883-903.
- 9-Rennke HG, Patel Y, Venkatachalam MA. Glomerular filtration of proteins: clearance of anionic, neutral, and cationic horseradish peroxidase in the rat. Kidney Int 1978;13:278-88.
- 10-Rennke HG, Venkatachalam MA. Glomerular permeability: in vivo tracer studies with polyanionic and polycationic ferritins Kidney Int 1977;11:44-53.
- 11-Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc Nat Acad Sci USA 2004;101:13368-73.
- 12-Bernard A, Vyskocyl A, Mahieu P, Lauwerys R. Effect of renal insufficiency on the concentration of free retinol-binding protein in urine and serum. Clin Chim Act 1988;171:85-93.
- 13-Flynn FV, Lapsley M, Sansom PA, Cohen SL. Urinary excretion of beta 2-glycoprotein-1 (apolipoprotein H) and other markers of tubular malfunction in "non-tubular" renal disease. J Clin Pathol 1992; 45:561-7.
- 14-McKee JA, Kumar S, Ecelbarger CA,

- Fernandez-Llama P, Terris J, Knepper MA. Detection of Na(+) transporter proteins in urine. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:2128-32.
- 15-Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, Robinson JH, Bures EJ, Beierle J, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics* 2001;1:93-107.
- 16-Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 2002;62:1461-9.
- 17-Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Jevans AW, Arthur JM. Sodium loading changes urinary protein excretion: a proteomic analysis. *Am J Physiol Ren Physiol* 2003;284:F1155-63.
- 18-Rasmussen HH, Orntoft TF, Wolf H, Celis JE. Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *J Urol* 1996;155:2113-9.
- 19-Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteom* 2002;1:845-67.
- 20-Anderson NG, Anderson NL, Tollaksen SL. Proteins of human urine. I. Concentration and analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin Chem* 1979;25:1199-210.
- 21-Bueler MR, Wiederkehr F, Vonderschmitt DJ. Electrophoretic, chromatographic and immunological studies of human urinary proteins. *Electrophoresis* 1995;16:124-34.
- 22-Thongboonkerd V, Klein JB, Arthur JM. Proteomic identification of a large complement of rat urinary proteins. *Neph Exp Nephrol* 2003;95:e69-78.
- 23-Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, Makusky AJ, Mondal M, Seonarain M, et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 2004;4:1159-74.
- 24-Davis MT, Spahr CS, McGinley MD, Robinson JH, Bures EJ, Beierle J, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. II. Limitations of complex mixture analyses. *Proteomics* 2001;1:108-17.
- 25-Fliser D, Wittke S, Mischak H. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical diagnostic purposes. *Electrophoresis* 2005;26:2708-16.
- 26-Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:219-27.
- 27-Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, Krokhn O, Weiler T, Rush D, et al. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Trans* 2005;5:729-38.
- 28-Neuhoff N, Kaiser T, Wittke S, Krebs R, Pitt A, Burchard A, et al. Mass spectrometry for the detection of differentially expressed proteins: a comparison of surface-enhanced laser desorption/ionization and capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spect* 2004;18:149-56.
- 29-Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)* 2005;10:283-90.
- 30-Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H, et al. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 2006;70:1847-57.
- 31-Hewitt SM, Dear J, Star RA. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1677-89.
- 32-Meier M, Kaiser T, Herrmann A, Kneueppel S, Hillmann M, Koester P, et al. Identification of urinary protein pattern in type 1 diabetic adolescents with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis. *J Diabetes Complicat* 2005;19:223-32.
- 33-Mischak H, Kaiser T, Walden M, Hillmann M, Wittke S, Herrmann A, et al. Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:485-95.
- 34-Rossing K, Mischak H, Parving HH, Christensen PK, Walden M, Hillmann M, et al. Impact of diabetic nephropathy and ang-



- iotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int* 2005; 68:193-205.
- 35-Jain S, Rajput A, Kumar Y, Uppuluri N, Arvind AS, Tatu U. Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorder. *J Assoc Phys India* 2005;53:513-20.
- 36-Sharma K, Lee S, Han S, Francos B, McCue P, Wassell R, et al. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of the urine proteome in human diabetic nephropathy. *Proteomics* 2005;5:2648-55.
- 37-Candiano G, Musante L, Bruschi M, Petretto A, Santucci L, Del Boccio P, et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:3139-48.
- 38-Mosley K, Tam FW, Edwards RJ, Crozier J, Pusey CD, Lightstone L. Urinary proteomic profiles distinguish between active and inactive lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1497-504.
- 39-Oates JC, Varghese S, Bland AM, Taylor TP, Self SE, Stanislaus R, et al. Prediction of urinary protein markers in lupus nephritis. *Kidney Int* 2005;68:2588-92.
- 40-Cutler P, Bell DJ, Birrell HC, Connelly JC, Connor SC, Holmes E, et al. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis* 1999; 20:3647-58.
- 41-Ngai HH, Sit WH, Jiang PP, Xu RJ, Wan JM, Thongboonkerd V. Serial changes in urinary proteome profile of membranous nephropathy: implications for pathophysiology and biomarker discovery. *J Proteom Res* 2006;5:3038-47.
- 42-Wittke S, Fliser D, Haubitz M, Bartel S, Krebs R, Hausadel F, et al. Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers. *J Chromatogr A* 2003;1013:173-81.
- 43-Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, Walden M, Rupprecht HD, Floege J, et al. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:2313-20.
- 44-Wittke S, Mischak H, Walden M, Kolch W, Radler T, Wiedemann K. Discovery of biomarkers in human urine and cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry: towards new diagnostic and therapeutic approaches. *Electrophoresis* 2005;26:1476-87.
- 45-Decramer S, Wittke S, Mischak H, Zurbig P, Walden M, Bouissou F, et al. Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nature Med* 2006;12:398-400.
- 46-Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol* 2006;7:230-40.
- 47-Lafitte D, Dussol B, Andersen S, Vazi A, Dupuy P, Jensen ON, et al. Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. *Clin Biochem* 2002;35:581-9.
- 48-Park MR, Wang EH, Jin DC, Cha JH, Lee KH, Yang CW, et al. Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA nephropathy. *Proteomics* 2006;6:1066-76.
- 49-Thongboonkerd V, Klein JB, Jevans AW, McLeish KR. Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. *Contrib Nephrol* 2004;141: 292-307.
- 50-Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:913-22.

## Application of Proteomics to Identify the Biomarkers of Glomerular Diseases

Meyfour A<sup>1</sup>, Rezaie Tavirani M<sup>1</sup>, Moayeri A<sup>2</sup>, Mohammadpour S<sup>2</sup>  
(Received: 7 August, 2013 Accepted: 14 November, 2013)

### Abstract

Glomerular Diseases affect the filtration function of nephrons. In many patients, kidney failure eventually leads to end-stage renal disease (ESRD). The causes of the glomerular diseases should be diagnosed to appropriately treat the disease. Although a renal biopsy determines definitive diagnosis of the cause of the disease, it is an invasive and potentially hazardous procedure. Urine testing for biomarkers could replace renal biopsy as a simple, safe, and accurate test that could be repeated to follow up progression of the disease and monitor

response to therapy. In recent years, in order to understand the mechanisms involved in glomerular disease, kidney injury and to distinct between them, notable proteomics studies have been done. It seems that by improvement of proteomic techniques in future, better results will be achieved. This article discusses this issue in detail.

Keywords: Proteomics, kidney, glomerular disease, biomarker

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
2. Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran  
\*Corresponding author