

## مطالعه پروتئوم ادراری بیماران مبتلا به IgA نفروپاتی و معرفی بیومارکرهای مرتبط با پیشرفت بیماری به روش آنالیز آماری نظارتی

شیوا کلانتری<sup>۱</sup>، محسن نفر<sup>۲\*</sup>، شیوا سماوات<sup>۳</sup>، مصطفی رضایی طاویرانی<sup>۴</sup>، مهدی پروین<sup>۵</sup>، دوروتیا روتیشازر<sup>۶</sup>، رومن زوبارو<sup>۷</sup>، راضیه امینی<sup>۸</sup>، علی صیدخانی<sup>۹</sup>

- (۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
- (۲) گروه دافلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
- (۳) علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
- (۴) گروه پاتولوژی، بیمارستان شهید لبافی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
- (۵) گروه بیوشیمی و بیوفیزیک پزشکی، انستیتو کارولینسکا، سوئد
- (۶) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان
- (۷) گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۷

### چکیده

**مقدمه:** IgA نفروپاتی شایع ترین علت گلومرولونفریتیس اولیه در اکثر کشورهای توسعه یافته است. از آن جایی که بیوپسی تنها راه تشخیص IgA نفروپاتی است، یافتن روشی آسان و غیرتهاجمی برای پروگنوزیس، تشخیص و درمان بیماری ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه تلاش شده است که بیومارکرهای کاندید که منعکس کننده وضعیت پیشرفت بیماری هستند در ادرار بیماران مبتلا به IgA نفروپاتی جستجو شوند.

**مواد و روش ها:** نمونه های ادراری از ۱۳ بیمار جمع آوری، پروتئوم آن ها استخراج شده و با نانو-کروماتوگرافی مایع به همراه تاندم MS آنالیز گردید. پروفایل پروتئینی به دست آمد و پروتئین های افتراقی بین بیماران با وضعیت بیماری پیشرفته و خفیف (بر حسب عملکرد کلیوی (eGFR)) با استفاده از آنالیز آماری OPLS-DA تعیین شد و تحت آنالیزهای بیوانفورماتیکی قرار گرفت.

**یافته های پژوهش:** یک پانل پروتئینی متشکل از ۵۰ پروتئین معنی دار به دست آمد که ۱۰ تا از بیومارکرهای کاندید برتر آن معرفی شد. درمسیدین و استئوپونتین بیشترین تغییرات را در بین پروتئین هایی داشتند به ترتیب افزایش و کاهش ظهور یافته بودند. سیستم کمپلمان و پاسخ ایمنی ذاتی به عنوان پروسه های مهم متفاوت معنی دار بین دو گروه بیمار معرفی شدند.

**بحث و نتیجه گیری:** پانل بیومارکرهای ادراری معرفی شده می تواند گشایشگر دیدگاهی جدید برای مکانیسم پیشرفت بیماری باشد و برای تشخیص غیرتهاجمی مفید واقع شود.

**واژه های کلیدی:** IgA نفروپاتی، پروتئوم ادراری، عملکرد کلیوی، بیومارکر

\*نویسنده مسئول: گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

**Email:** Nafar@sbm.ac.ir

## مقدمه

پروتئومیکس به عنوان علمی جدید با تکنولوژی بالا و امکان بررسی تعداد زیادی پروتئین به طور هم زمان، امروزه در مطالعات تشخیصی و به خصوص کشف بیومارکرها در کانون توجه است. مطالعات پروتئومیکی زیادی نیز در زمینه ارائه بیومارکرهای پروتئومیک و تشخیصی برای IgA Nephropathy صورت گرفته از جمله مطالعه ای که توسط پارک و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، (۱۱)، که جزء اولین مطالعات پروتئومیکی برای مشخص کردن بیومارکرهای پروتئومیک IgA nephropathy بود. آن ها با استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی (2DE) و MALDI-TOF MS موفق به شناسایی ۸۴ پروتئین با بیان افتراقی بین بیماران با کلاس های مختلف شدند. به دنبال آن کواک و همکاران نیز مطالعه مشابهی را انجام داده و پروتئین AAT (alpha-1-anti-trypsin) را به عنوان بیومارکر افزایش بیان داشته (up regulate شده) در ادرار و هم چنین کورتکس بیماران معرفی کردند، (۱۲). سایر مطالعات مشابه پروتئومیکی در منابع ۱۳ تا ۱۸ آورده شده است، (۱۳-۱۸). با توجه به مطالعات انجام شده تاکنون هیچ یک موفق به ارائه بیومارکرهای معتبر و مورد توافقی نشده اند. در مطالعه حاضر، تلاش شده است تا با استفاده از ابزار پروتئومیکسی با قدرت تفکیک بالا و با استفاده از پروفایل پروتئینی اداری به عنوان روشی غیرتهاجمی، بیومارکرهای اداری پروتئومیک افتراقی بین بیماران با پروگنوز بهتر و بدتر معرفی شوند.

## مواد و روش ها

مشخصات فیزیولوژیک و پاتولوژیک بیماران: ۱۳ بیمار (۱۱ مرد و ۲ زن) در محدوده سنی ۱۸-۵۲ سال با میانگین ۳۳ در بیمارستان لبافی نژاد که با بیوپسی، مبتلا بودن آن ها به بیماری IgA Nephropathy تایید شده است در این مطالعه در نظر گرفته شدند. (جدول شماره ۱) نمونه های بیوپسی برای به حداقل رساندن خطا در تشخیص توسط یک پاتولوژیست واحد مورد بررسی قرار گرفتند. برای تخمین میزان دفع پروتئین، از ادرار ۲۴ ساعته استفاده شد که غلظت آن به طور میانگین mgr/day ۳۰۱۰

IgA Nephropathy که برای اولین بار حدود چهار دهه پیش به عنوان یکی از انواع بیماری های کلیوی شناسایی شد، یکی از شایع ترین دلایل گلوبولونفریتیس اولیه در کشورهای در حال توسعه است و هم اکنون نیز به عنوان یکی علل مهم ESRD (end-stage renal disease) مطرح است، (۱،۲). این بیماری در سیاهپوستان نسبت به آسیایی ها یا افراد سفید پوست کمتر شایع می باشد، (۳). امروزه نفرولوژیست ها دریافته اند که IgA Nephropathy یک بیماری خرنده و خاموش با پیشروی کند است، (۴). مشخصه اصلی بیماری عبارتست از رسوب پلیمرهای IgA۱ بر روی سلول های مزانشیال گلوبول به همراه رسوبات جزئی بر روی سلول های پودوسایت و اپیتلیال توبول ها، (۵،۶)، با این حال هیچ همبستگی بین میزان رسوب IgA۱ و درجه آسیب کلیوی وجود ندارد. (۴)

رسوبات IgA۱ موجب فعال شدن پروسه های التهابی می شود که در نهایت به تکثیر سلول های مزانشیال، اسکروزیز و ESRD (پس از گذشت تقریباً ۱۰ تا ۲۰ سال) می انجامد، (۷)، که در این مرحله بیماران ناگزیر از دیالیز و یا پیوند کلیه هستند. مکانیسم این بیماری هنوز به درستی مشخص نیست و outcome بیماران هم بسیار متنوع است، (۸)، بنا بر این تعیین یک راه تشخیصی دقیق برای این بیماری چالش بزرگی محسوب می شود به خصوص که راه کلاسیک تشخیصی برای آن بیوپسی کلیوی بوده که یک روش تهاجمی است و می تواند مشکلاتی مانند عفونت و یا هماتوم را به همراه داشته باشد، (۹). یک سری محدود از مارکرهای بیوشیمیایی ادرار و سرم علاوه بر هیستوپاتولوژی کلیه و ایمنو هیستوشیمی امروزه برای تشخیص مورد استفاده قرار می گیرند که برای دهه های طولانی بدون تغییر باقی مانده و حساسیت لازم را ندارند، (۹)، که از جمله آن ها می توان به کراتینین سرم و نیتروژن اوره خون اشاره کرد، (۱۰). به نظر می رسد پروتئومیکس بتواند روش مناسبی برای یافتن بیومارکرهای قابل اعتماد تر و دقیق تر و البته غیرتهاجمی برای این بیماری باشد.

با بیشترین فراوانی که باری بیش از ۲ داشته باشند انجام می دهد. فایل های MS طبق مراحل که در منبع شماره ۱۹ توضیح داده شده آماده شد و بر علیه داده پایگاه Swiss Prot با موتور جستجوی Mascot جستجو شد. مقادیر نسبی پروتئین های شناسایی شده پس از این جستجو، با استفاده از نرم افزار Quanti (۲۰)، بر طبق روش label-free quantification تعیین گردید. ماتریس پروتئینی حاصل، پس از نرمال کردن مقادیر که توسط خود نرم افزار Quanti صورت گرفت و تبدیل آن ها به فرم لگاریتمی وارد آنالیزهای آماری چند متغیره شد. در این مطالعه از روش OPLS-DA (orthogonal projection to latent structures discriminant analysis) (۲۱)، توسط نرم افزار آماری SIMCA برای ارائه مدل پیشگویی کننده و مشخص کردن پروتئین های با بیان متفاوت بین دو گروه بیماران با بیماری خفیف و پیشرفته استفاده شد. بر اساس cross validation و اسکورهای حاصل از آن نمودار ROC برای ارزیابی مدل ترسیم گردید. سپس نتایج حاصل برای ارائه تفاسیر بیولوژیک تحت آنالیزهای بیوانفورماتیکی با استفاده از نرم افزار DAVID قرار گرفتند.

### یافته های پژوهش

به طور کلی ۲۳۲ پروتئین توسط nLC-MS/MS شناسایی شد و مقادیر نسبی آن ها با FDR (false discovery rate) کمتر از ۱ درصد تعیین گردید. مدل پیشگویی کننده ساخته شده بر اساس ماتریس پروتئینی توانست با دقت حدود ۹۰ درصد بین دو گروه بیمار با عملکرد کلیوی کمتر و بیشتر از  $60 \text{ cc/min/1.73m}^2$  افتراق ایجاد کند. این مدل در شکل شماره ۱-الف نشان داده شده است. پارامترهای مربوط به فاکتورهای پیشگویی کننده و برازش مدل به ترتیب عبارت بودند از  $R_2=0.516$  و  $Q_2=0.517$ . نمودار ROC ترسیم شده بر اساس اسکورهای cross validation در شکل شماره ۱-ب نمایش داده شده است. ناحیه زیر منحنی (AUC) در این نمودار  $0.911$  می باشد که نشان دهنده دقت بالا و کیفیت مدل ارائه شده است. پروتئین های معنی دار حاصل از این مدل ۱۲۹ عدد بود. برای

تخمین زده شد. برای ارزیابی عملکرد کلیوی از eGFR (estimated glomerular filtration rate) با معادله CKD-EPI استفاده شد. میانگین eGFR بیماران  $67/7 \text{ cc/min/1.73m}^2$  بود. بیماران بر اساس GFR به دو گروه تقسیم شدند. بیمارانی که GFR در آن ها بیشتر از ۶۰ درصد بود، ( $11,13,10,9,4,2$ )، که پروگنوز بهتری داشته و بیماری آن ها خفیف تر است و گروه دوم بیمارانی که GFR در آنها کمتر از ۶۰ درصد بود، ( $12,8,7,5,3,1$ )، که پروگنوز بدتری داشته و بیماری آن ها پیشرفته تر گزارش شده بود. این دو گروه در مرحله بعدی وارد آنالیزهای چندمتغیره گردید.

کروماتوگرافی مایع کوپل شده با دستگاه اسپکترومتری جرمی: جمع آوری نمونه های ادراری و آماده سازی آن ها برای تزریق به کروماتوگرافی مایع بر طبق پروتوکول توضیح داده شده در منبع شماره ۱۹ به انجام رسید. آزمایشات کروماتوگرافی مایع به همراه تاندم MS (nLC-MS/MS) بر روی سیستم Easy-nLC کوپل شده با دستگاه اسپکترومتر جرمی Q Exactive صورت گرفت. ستون مورد استفاده در آزمایشگاه با استفاده از ذرات C18 توسط پمپ خلاء تحت فشار ۴۰ بار پر شد. بافرهای فاز متحرک شامل بافر A (اسید فرمیک ۰/۱ درصد در آب) و بافر B (اسید فرمیک ۰/۱ درصد در استونیتریل) بودند. گرادین استفاده شده برای LC عبارت بود از: ۵-۳۵ درصد بافر B در ۸۹ دقیقه، ۸۰-۴۸ درصد بافر B در ۵ دقیقه و ۸۰ درصد بافر B در ۵ دقیقه که همه با سرعت ۳۰۰ نانولیتتر در دقیقه تزریق شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول پیتیدی که معادل ۲/۳ گرم از پروتئین تام استخراج شده از ادرار بود برای این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. آزمایشات برای هر نمونه به صورت duplicate انجام شد.

آنالیزهای اسپکترومتری جرمی و آنالیزهای آماری: برای اسپکترومتری جرمی ابتدا دستگاه یک اسکن کامل در محدوده  $300 \text{ m/z}$  تا  $1650 \text{ m/z}$  با قدرت تفکیک  $R=70000$  در  $400 \text{ m/z}$  انجام داده و سپس MS/MS را با روش HCD (high energy collision dissociation) بر روی ۱۰ یون پیش ساز

کاهش تعداد بیومارکرها و دستیابی به یک پانل قابل اعتمادتر، پروتئین‌ها بر اساس دو معیار دیگر فیلتر شدند: درصد missing و fold change. بدین معنی که پروتئین‌هایی که بیش از ۵۰ درصد missing داشته و پروتئین‌هایی که کمتر از ۱/۵ برابر تغییر داشته اند از لیست مورد نظر حذف گردید. بر این اساس تعداد بیومارکرها به ۵۰ عدد رسید که ۳۰ پروتئین در گروه بیماران با بیماری پیشرفته کاهش ظهور

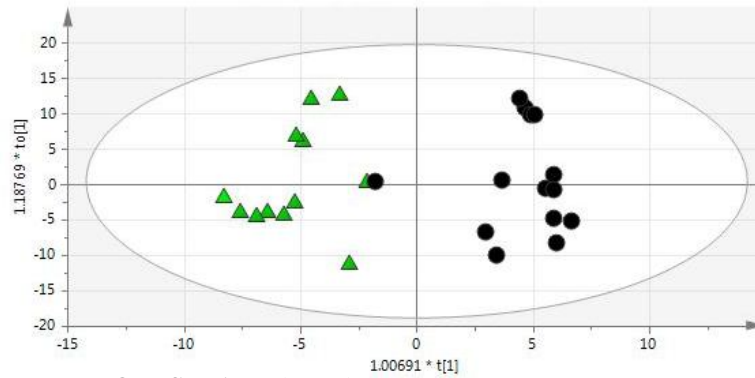
کاهش تعداد بیومارکرها و دستیابی به یک پانل قابل اعتمادتر، پروتئین‌ها بر اساس دو معیار دیگر فیلتر شدند: درصد missing و fold change. بدین معنی که پروتئین‌هایی که بیش از ۵۰ درصد missing داشته و پروتئین‌هایی که کمتر از ۱/۵ برابر تغییر داشته اند از لیست مورد نظر حذف گردید. بر این اساس تعداد بیومارکرها به ۵۰ عدد رسید که ۳۰ پروتئین در گروه بیماران با بیماری پیشرفته کاهش ظهور

جدول شماره ۱. مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران

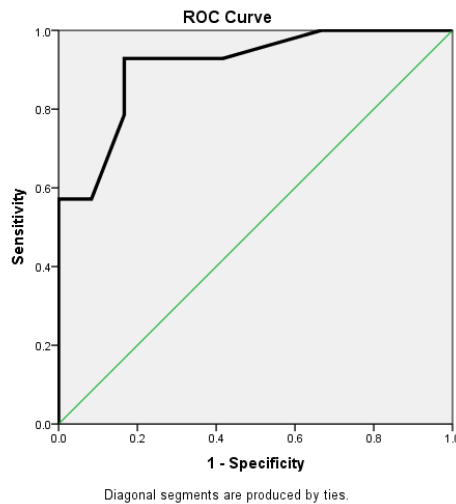
کد بیمار	سن (سال)	جنسیت	eGFR (عملکرد کلیوی) (cc/min/1.73m2)	پروتئین ادرار (mg/day)	درصد آتروفی تیوبولار / فیبروز
۱	۵۲	مرد	۴۴/۱۰	۴۶۰۰	۱۰-۱۵٪
۲	۱۸	مرد	۱۱۹/۴۲	۱۰۰۰	۱۵-۲۰٪
۳	۲۹	مرد	۸/۵۸	۶۰۰۰	۸۰٪
۴	۴۲	مرد	۷۹/۵۲	۶۴۲۰	۱۰٪
۵	۲۹	مرد	۴۶/۶۰	۷۰۲۰	۸۰٪
۶	۲۸	زن	۱۱۷/۹۱	۱۶۸۰	<۱۰٪
۷	۳۲	مرد	۴۹/۰۴	۴۱۰۰	۳۰-۴۰٪
۸	۲۸	زن	۱۶/۱۱	۲۳۳۰	۸۰٪
۹	۲۳	مرد	۶۳/۶۵	۸۰۰	۲۰٪
۱۰	۳۴	مرد	۹۷/۷۶	۱۳۱۰	۱۰٪
۱۱	۴۵	مرد	۶۸/۰۱	۷۲۰	<۱۰٪
۱۲	۳۴	مرد	۳۵/۷۱	۲۶۴۰	۶۰٪
۱۳	۴۲	مرد	۱۳۳/۵۱	۵۲۰	<۱۰٪

جدول شماره ۲. لیست ۱۰ بیومارکر برتر افتراقی بین بیماران با بیماری پیشرفته و خفیف به همراه خصوصیات مربوط به هر پروتئین.

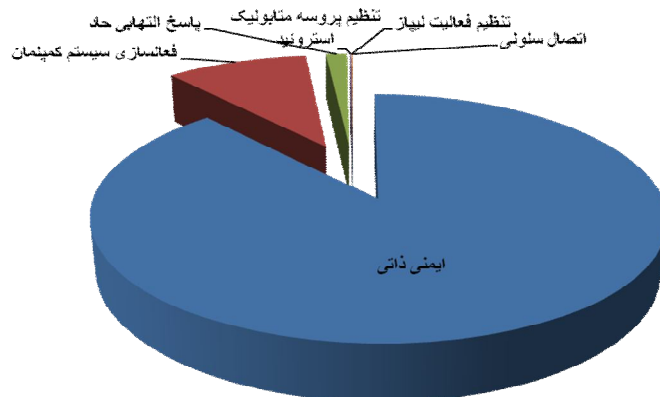
کد پروتئین	نام پروتئین	پروسه بیولوژیک	محل سلولی	عملکرد مولکولی	میزان تغییر در بیماران پیشرفته نسبت به خفیف (fold change)	افزایش یا کاهش دفع
OSTP	استئوپونین	دخالت در پاسخ التهابی/پاسخ به هورمون استروئیدی/پاسخ به ویتامین D	فضای خارج سلولی/ویزیکول های متصل به غشاء	اتصال به ماتریکس خارج سلولی	۲/۹	کاهش
CO6A1	زنجیره آلفا-۱ کلانن VI	اتصال سلولی	کلانن نوع VI/ لومن شبکه اندوپلاسمی	اتصال به فاکتور رشد مشتق شده از پلاکت	۲/۸	کاهش
IBP7	پروتئین شماره ۷ اتصالی به فاکتور رشد شبه انسولین	تنظیم رشد سلولی/اتصال سلولی	فضای خارج سلولی	محرك اتصال سلولی	۲/۸	کاهش
LG3BP	پروتئین اتصالی به گالکتین ۳	اتصال سلولی	فضای خارج سلولی	فعالیت به عنوان گیرنده scavenger	۲/۷	کاهش
TFF2	فاکتور ۳ trefoil	تنظیم مثبت تکثیر سلولی/تنظیم منفی پاسخ التهابی	فضای خارج سلولی	مهار ترشح اسید معده	۲/۶	کاهش
A2MG	ماکروگلوبولین آلفا-۲	تنظیم منفی سیستم کمپلمان	فضای خارج سلولی/اسیتوزول	اتصال به اینترلوکین-۱ و فاکتور نکروز توموری	۲/۹	افزایش
TTHY	ترانستیرین	پروسه انتقال/پروسه متابولیک رتینوئید	فضای خارج سلولی	اتصال به هورمون	۴/۵	افزایش
APOA1	آپولیپوپروتئین A-1	پروسه متابولیک لیپوپروتئین/تنظیم منفی پاسخ التهابی/تکثیر سلولی اندوتلیال	سیتوزول/هسته/غشاء سلولی	اتصال به کلسترول/فالیست مهارکنندگی لیپاز/اتصال به فسفولیپید	۴/۸	افزایش
IGHG3	ناحیه C زنجیره -۳-ایمونوگلوبولین گاما	فعالسازی سیستم کمپلمان/پاسخ ایمنی ذاتی	فضای خارج سلولی/ غشاء	اتصال به آنتی ژن	۴/۸	افزایش
DCD	درمسیدین	پروتئولیز/کشتن سلول های ارگانسیم های دیگر	فضای خارج سلولی	فعالیت پپتیدازی	۹/۶	افزایش



شکل شماره ۱-الف. score پلات مدل پیشگویی کننده به دست آمده با آنالیز OPLS-DA. دایره ها نشانگر بیماران با بیماری خفیف که eGFR آن ها بیشتر از ۶۰ cc/min/1.73m2 بوده و مثلث ها نمایشگر بیماران با بیماری پیشرفته که eGFR آن ها کمتر از ۶۰ cc/min/1.73m2 بوده است. Duplicate ها هم در این پلات وارد شده اند.



شکل شماره ۱-ب. نمودار ROC مربوط به مدل پیشگویی کننده. ناحیه زیر منحنی ۰/۹۱۱ می باشد که نشان دهنده دقت بالای مدل است.



شکل شماره ۲. نمودار پروسه های بیولوژیک معنی دار حاصل از پانل بیومارکری که توسط نرم افزار DAVID به دست آمده است.

## بحث و نتیجه گیری

IgA nephropathy یک بیماری کلیوی خزنده با پیشرفت کند و شیوع بالاست که فرد مبتلا را پس از گذشت ۱۰ تا ۲۰ سال مجبور به پیوند کلیه و یا دیالیز می کند که در این مرحله اصطلاحاً گفته می شود بیماری به ESRD رسیده است. ارائه بیومارکرهای پروتئینی تشخیصی و پروگنوستیک که با استفاده از آن ها بدون نیاز به روش های کلاسیک تهاجمی از قبیل بیوپسی بتوان پیشرفت بیماری را تخمین زد برای بیماران بسیار مفید خواهد بود. پروتئومیکس زمینه ایست که راه را برای کشف چنین بیومارکرهایی باز می کند و در سال های اخیر نیز به خصوص برای این بیماری مطالعات پروتئومیکسی جالب توجهی صورت گرفته است. در مطالعه حاضر، به جستجوی بیومارکرهایی پرداخته ایم که در ادرار این بیماران که از نظر عملکرد کلیوی با هم اختلاف داشتند و بر این اساس به دو دسته وخیم و خفیف تقسیم شده اند با هم متفاوت بودند.

بیشترین تغییر در بین پروتئین هایی که در بیماران با بیماری پیشرفته افزایش دفع داشته مربوط به درمسیدین (DCD) می باشد. معروف ترین فعالیت این پروتئین عملکرد آنتی میکروبیال آن گزارش شده است، اما شواهدی وجود دارد که نشان می دهد این پروتئین طیف وسیعی از عملکردهای مختلف داشته و دخالت آن در برخی سرطان ها از جمله سرطان پستان از طریق اثر تحریکی بر رشد سلولی گزارش شده است، (۲۳-۲۱). حضور این پروتئین به عنوان یکی از پروتئین های مربوط به سیستم ایمنی ذاتی در ادرار افراد نرمال قبلاً گزارش شده است، (۲۴)، بنا بر این افزایش دفع آن در IgA nephropathy که سیستم ایمنی و پروسه های التهابی به موجب رسوب کمپلکس های ایمنی حاوی IgA در گломول، در آن فعال هستند غافلگیر کننده نیست. به علاوه اثر این پروتئین در تکثیر سلولی نیز می تواند با تکثیر افزایش یافته سلول های مزانشیال در IgA nephropathy مرتبط باشد.

استئوپونین (OSTP) پروتئین دیگری است که بیشترین تغییر را در بین پروتئین های کاهش دفع داشته در بیماران پیشرفته تر به خود اختصاص داده

است. استئوپونین یک فسفوپروتئین مترشحه از بسیاری از سلول ها با منشاء اپیتلیال، مزنشیال و هماتوپویتیک است، (۲۵). این پروتئین در کلیه در توبول ها و مجاری جمع کننده بیان شده و در ادرار دفع می گردد. کاهش دفع آن در بیماران مبتلا به IgA nephropathy در سال ۲۰۰۱ توسط جانگ و همکاران گزارش شده است که داده های ما نیز آن را تأیید می کند. دخالت استئوپونین در پاتوژنز IgA nephropathy به موجب اتصال آن به CD44 بوده که مهاجرت لوکوسیتها و فعال شدن آن ها را تنظیم می کند. (۲۶)

آنالیزهای بیشتر بر روی پانل بیومارکری یافت شده برای ارائه تفاسیر بیولوژیک با استفاده از نرم افزار DAVID صورت گرفت، (۲۷). آنالیزهای Gene Ontology Enrichment نشان داد که معنی دار ترین پروسه بیولوژیک درگیر در پیشرفت بیماری و تفاوت بین دو گروه بیمار، پروسه پاسخ ایمنی ذاتی ( $P=2 \times 10^{-7}$ ) است. فعالسازی سیستم کمپلمان هم در رده دوم قرار دارد، ( $P=1.8 \times 10^{-6}$ ) پروسه های بیولوژیک معنی دار در شکل شماره ۲ نشان داده شده اند. این آنالیزها برای عملکرد مولکولی، فعالیت مهارکنندگی اندوپیتیداز را معنی دار ترین ( $P=5.3 \times 10^{-5}$ ) مورد نشان داد. مسیر کمپلمان در آنالیزهای pathway که با استفاده از نرم افزار DAVID بر علیه دو داده پایگاه KEGG و BIOCARTA صورت گرفت نیز معنی دار شد ( $P=2.1 \times 10^{-6}$  BIOCARTA و  $P=8.7 \times 10^{-6}$  KEGG). معنی دار شدن مسیر کمپلمان هم در پروسه های بیولوژیک و هم pathway نشان دهنده اهمیت این مسیر در پاتوژنز و پیشرفت روند بیمار است. دخالت این مسیر در IgA nephropathy پیش از این به اثبات رسیده و شواهدی دال بر آن در مطالعات قبلی وجود دارد که در نتایج ما نیز ظهور پیدا کرد، (۲۸)

نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعه قبلی، (۱۹)، که بر روی همین گروه از بیماران به انجام رسیده بود اما در آنالیزهای آماری برخلاف مطالعه حاضر، بیومارکرهای به دست آمده با استفاده از PCA (principal component analysis) ملاک ایجاد

به عنوان جمع بندی می توان گفت که در این مطالعه بیومارکرهایی که بیشترین اهمیت را در پیشرفت بیماری IgA nephropathy داشته اند گزارش شده است. این بیومارکرها از نظر تشخیص روند بیماری به صورت غیرتهاجمی بر روش های کلاسیک تهاجمی کنونی مانند بیوپسی برتری داشته و هم چنین اطلاعات مفیدی را در زمینه مکانیسم بیماری ارائه می دهند. پروتئین های درمسیدین و استئوپوننتین دارای بیشترین تغییرات به ترتیب به لحاظ افزایش و کاهش دفع در دو گروه بیمار با وضعیت پیشرفته و خفیف بودند. مسیر کمپلمان و پروسه ایمنی ذاتی نیز در آنالیزهای بیوانفورماتیکی معنی دار شده که نمایانگر اهمیت آن ها در پروگنوز و پیشرفت بیماریست.

### سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات کلیه و مجاری ادراری، مرکز تحقیقات پروتئومیکس و هم چنین Karolinska Institute سپاسگزاری می شود.

### References

- 1-Sanders JT, Wyatt RJ. IgA Nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:163-70.
- 2-Roufosse CA, Cook HT. Pathological predictors of prognosis in immunoglobulin-in a nephropathy: a review. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:212-9.
- 3-Nair R, Walker PD. Is IgA nephropathy the commonest primary glomerulopathy among young adults in the USA? *Kidney Int* 2006;69:1455-8.
- 4-Lai KN. Pathogenesis of IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:275-83.
- 5-Chan LY, Leung JC, Tsang AW, Tang SC, Lai KN. Activation of tubular epithelial cells by mesangial-derived TNF- $\alpha$ : glomerulotubular communication in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:602-12.
- 6-Lavigne KA, Woodford SY, Barker CV, Julian BA, Novak J, Moldoveanu Z, et al. Familial IgA nephropathy in southeastern Kentucky. *Clin Nephrol* 2010;73:115-21.
- 7-Floege J. Recurrent IgA nephropathy after renal transplantation. *Semin Nephrol* 2004;24:287-91.
- 8-Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L, Cattran DC. Predicting progression in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001;38:728-35.

یک مدل پیشگویی کننده قرار گرفت همبستگی وجود دارد. در مطالعه حاضر معیار قضاوت در مورد پیشرفت بیماری عملکرد کلیوی (eGFR) بود در حالی که در مطالعه قبلی بیماران بر اساس تفاوت مقادیر پروتئین ها و به صورت غیرنظارتی (unsupervised) تقسیم بندی شده بودند.

در بین بیومارکرهای معرفی شده در دو مطالعه آپولیپوپروتئین ۴-A (APOA4)، فاکتور کمپلمان-۳ (CO3)، آپولیپوپروتئین ۱-A (APOA1) و آلفا-۱- ماکروگلوبولین (AMBP) مشترک بودند که نشان دهنده اهمیت آن ها در پاتوژنز و پیشرفت بیماریست که هم در آنالیز غیرنظارتی مطالعه قبل و هم آنالیز نظارتی (supervised) مطالعه حاضر ظهور یافته اند. بنا بر این این بیومارکرها کاندیدهای مناسبی برای آزمایشات بعدی هستند که در جامعه بزرگ تر ارزیابی شوند.

- 9-Panteghini M, Myers GL, Miller WG, Greenberg N. The Importance of metrological traceability on the validity of creatinine measurement as an index of renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1287-92.
- 10-Urbschat A, Obermüller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers* 2011;16 Suppl 1:S22-30.
- 11-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.
- 12-Kwak NJ, Wang EH, Heo IY, Jin DC, Cha JH, Lee KH, et al. Proteomic analysis of alpha-1-antitrypsin in immunoglobulin a nephropathy. *Proteomics* 2007; 1:420-8.
- 13-Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, Walden M, Rupperecht HD, Floege J, et al. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:2313-20.
- 14-Julian BA, Wittke S, Novak J, Good DM, Coon JJ, Kellmann M, et al. Electrophoretic methods for analysis of urinary polypeptides in IgA-associated renal diseases. *Electrophoresis* 2007;28:4469-83.



- 15-Yokota H, Hiramoto M, Okada H, Kanno Y, Yuri M, Morita S, et al. Absence of increased alpha-1-microglobulin in IgA nephropathy proteinuria. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:738-44.
- 16-Rocchetti MT, Centra M, Papale M, Bortone G, Palermo C, Centonze D, et al. Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. *Proteomics* 2008;8:206-16.
- 17-Thongboonkerd V, Songtawee N, Sritippayawan S. Urinary proteome profiling using microfluidic technology on a chip. *J Proteome Res* 2007;6:2011-8.
- 18-Wu J, Wang N, Wang J, Xie Y, Li Y, Liang T, et al. Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24:1971-8.
- 19-Kalantari S, Rutishauser D, Samavat S, Nafar M, Mahmudieh L, Rezaei-Tavirani M, et al. Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. *PLOS ONE* 2013. (In press)
- 20-Lindén M, Lind SB, Mayrhofer C, Segersten U, Wester K, Lyutvinskiy Y, et al. Proteomics analysis of urinary biomarker candidates for nonmuscle invasive bladder cancer. *Proteomics* 2012;12:135-44.
- 21-Lee Motoyama JP, Kim-Motoyama H, Kim P, Nakagama H, Miyagawa K, Suzuki K. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;15;357:828-33.
- 22-Porter D, Weremowicz S, Chin K, Seth P, Keshaviah A, Lahti-Domenici J, et al. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10931-6.
- 23-Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* 1996; 379:739-42.
- 24- Hiemstra TF, Charles PD, Hester SS, Al-Lamki R, Su Y, Robinson C, et al. Exosomes in human urine as innate immune effectors. *Clin Kidney J* 2011;4:23-26.
- 25-Gang X, Ueki K, Kon S, Maeda M, Naruse T, Nojima Y. Reduced urinary excretion of intact osteopontin in patients with iga nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001;37: 374-9.
- 26-Sano N, Kitazawa K, Sugisaki T. Localization and Roles of CD44, Hyaluronic acid and osteopontin in iga nephropathy. *Nephron* 2001;89:416-21.
- 27-Dennis GJr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* 2003;4:3.
- 28-Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1724-34.

## Studying The Urinary Proteome of Patients With IgA Nephropathy and Introducing The Biomarkers Relevant to Disease Progression Using Supervised Statistical Analysis

Kalantari S<sup>1</sup>, Nafar M<sup>2\*</sup>, Samavat S<sup>2</sup>, Rezaei tavirani M<sup>3</sup>, Parvin M<sup>4</sup>, Rutishauser D<sup>5</sup>, Zubarev R<sup>5</sup>, Amini R<sup>6</sup>, Saidkhani A<sup>7</sup>

(Received: 7 May.2013

Accepted: 6 Aug. 2013)

### Abstract

**Introduction:** IgA nephropathy is the most common cause of primary glomerulonephritis throughout the most of developed countries. Since the biopsy is the only way for diagnosis of IgA nephropathy, finding an easy and non-invasive method seems to be necessary for prognosis, diagnosis and treatment of this disease. In this study, it was attempted to find some urine candidate biomarkers that represent the progression of disease in patients with IgA nephropathy.

**Materials & Methods:** Urine samples from 13 patients were collected and their proteome were extracted and analyzed with nano-LC-MS/MS. The protein profile was obtained and those differential proteins between patients with advanced and mild disease states (based on the renal function; eGFR) were determined using orthogonal projection to latent structure discriminant

analysis (OPLS-DA) and the acquired data underwent bioinformatics analysis.

**Findings:** A panel composed of 50 significant proteins was obtained in which 10 top candidate biomarkers were introduced. Dermcidin and Osteopontin had highest variation amongst the proteins, so that they overrepresented and underrepresented, respectively. Complement system and innate immune response were introduced as the significantly important different processes between two groups of patients.

**Discussion & Conclusion:** The introduced panel of urinary biomarkers can open a new insight to the mechanism of disease progression and may be helpful as a non-invasive diagnosis method.

**Keywords:** IgA nephropathy, urine proteome, renal function, biomarker

1. Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept of Basic Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Dept of Pathology, Shahid Labafinejad Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Dept of Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Sweden

6. Dept of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamada Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

7. Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam, Iran

\*(corresponding author)