

# Bioinformatics analyzing of genes expression alterations in peripheral blood monocyte cells of osteoarthritis patients

Akram Gholipour<sup>1</sup>, Mahrokh Bagheri Moghaddam<sup>1</sup>, Mahshid Malakootian<sup>1</sup>, Maziar Oveisee<sup>2\*</sup>

1. Cardiogenetic Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Orthopedic Department, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran

## Abstract

**Aim and Background:** Osteoarthritis (OA) is the most common chronic joint disease in the world and the main cause of movement disorders in the elderly. Identification the precise molecular pathogenesis pathways of osteoarthritis disease, early diagnosis and effective treatment for OA is challenging because OA pathogenesis is still unclear. Therefore, one of the key and important goals of OA disease is to identify sensitive biomarkers, which is very valuable and effective for clinical applications, considering the availability of peripheral blood samples. The present study aimed to find differential expression genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of OA patients and introduced a reliable biomarker to distinguish OA via bioinformatics analysis.

**Material and methods:** The microarray dataset of PBMCs of OA patients and normal individuals (GSE48556) was obtained from the GEO database. Differential expression analysis between OA and normal groups was performed using GEO2R and genes with differential expression were isolated. Signaling pathways and GO analysis were determined using Enrichr databases. Next, genes with differential expression were introduced and ROC curve analysis was performed for analysis the probability of the selected gene as a biomarker.

**Results:** The bioinformatics results showed 1515 genes had significant differential expression which 657 genes upregulated and 858 genes downregulated. Analysis of signaling pathways showed that proteasome pathways, chemokine signaling pathway and FoxO signaling pathway are important in this disease. It was also found that the *SRSF10* gene has the most downregulation in OA patients and the ROC curve analysis showed that this gene can differentiate OA patients from healthy individuals with high sensitivity and specificity.

**Conclusion:** Overall, our data demonstrated that the differential genes expressions have potentially to be considered as biological biomarkers with diagnostic and therapeutic target approaches. In this regard, the reduction of *SRSF10* gene expression can probably be a biomarker to identify OA disease in PBMC cells, which should be confirmed in experimental analysis.

**Keywords:** osteoarthritis, biomarkers, bioinformatics, *SRSF10* gene, microarray, Iau Science.

### Corresponding author:

Orthopedic Department, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran

Email: Maziar.oveisee@gmail.com

## بررسی بیوانفورماتیکی پروفایل تغییرات بیان ژنی در سلول‌های

### مونوسیت خون محیطی بیماران مبتلا استئوآرتریت

اکرم قلی پور<sup>۱</sup>، ماهرخ باقری مقدم<sup>۱</sup>، مهشید ملکوتیان<sup>۱</sup>، مازیار اویسی<sup>۲\*</sup>

۱. مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲. گروه ارتوپدی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی بم، بم، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** استئوآرتریت (OA) شایع‌ترین بیماری مزمن مفصلی در جهان و علت اصلی اختلال حرکتی در افراد مسن می‌باشد. با توجه به مشخص نبودن مسیرهای پاتوژنز دقیق مولکولی بیماری استئوآرتریت، تشخیص زود هنگام و درمان موثر برای OA چالش برانگیز است. بنابراین، یکی اهداف کلیدی و مهم بررسی بیماری OA در این مطالعه، شناسایی نشانگرهای زیستی حساس می‌باشد که با توجه به دست یابی و در دسترس تر بودن نمونه خون محیطی شناسایی بیومارکرهای حساس تشخیصی OA در خون محیطی برای کاربردهای بالینی بسیار ارزشمند و موثر است. مطالعه حاضر با هدف یافتن ژن‌های با بیان متفاوت و معرفی بیومارکر مولکولی قابل اعتماد برای OA به صورت بیوانفورماتیکی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** مجموعه داده‌های ریزآرایه به شماره GSE48556 از پایگاه داده GEO به دست آمد. تجزیه و تحلیل بیان افتراقی بین گروه OA و نرمال با استفاده از GEO2R انجام شد و ژن‌های دارای تفاوت بیان با بررسی پارامترهای آماری  $\text{adj.p.vaul} < 0.05$  و  $\log_{2}FC \geq 1$  در طی آنالیز بیوانفورماتیکی جداسازی شدند، سپس مسیرهای سیگنالینگ و آنالیز GO ژن‌های جداسازی شده با استفاده از پایگاه‌های داده Enrichr تعیین شد. در ادامه ژن‌های دارای بیشترین تغییر بیان معرفی شد و برای احتمال بیومارکر بودن ژن با بیشترین تغییر بیان آنالیز منحنی ROC در نرم افزار GraphPad\_Prism\_8.0.1 انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج بیوانفورماتیکی بیان ژن نشان داد که ۱۵۱۵ ژن دارای تفاوت بیان معنادار بودند. از این تعداد ۶۵۷ ژن افزایش بیان و ۸۵۸ ژن کاهش بیان معنی دار را نشان دادند. تجزیه و تحلیل مسیرهای سیگنالینگ نشان داد که مسیرهای پروتئازوم، مسیر سیگنالینگ کموکاین و مسیر سیگنالینگ FoxO در این بیماری اهمیت دارند. همچنین مشخص شد که ژن *SRSF10* بیشترین کاهش بیان را دارد و آنالیز منحنی ROC نشان داد این ژن می‌تواند با حساسیت و دقت بالایی توانایی تمایز افراد مبتلا به OA را از افراد سالم داشته باشد زیرا، با استفاده از میزان بیان ژن بدست آمده در بررسی با GEO2R و همچنین آنالیز منحنی ROC در نرم افزار GraphPad\_Prism\_8.0.1 میزان حساسیت و دقت تعیین شد.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع، داده‌های ما نشان داد که ژن‌ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی جدید با سودمندی بالقوه در تشخیص OA عمل کنند و به عنوان بیومارکرهای مولکولی جدید برای تشخیص این بیماری در نظر گرفته شوند. در این راستا کاهش بیان ژن *SRSF10* احتمالاً می‌تواند یک نشانگر زیستی برای شناسایی بیماری OA در سلول‌های PBMC باشد که بایستی به صورت آزمایشگاهی تایید شود.

**واژگان کلیدی:** استئوآرتریت، نشانگرهای زیستی، بیوانفورماتیک، ژن *SRSF10*، ریزآرایه، Iau Science.

### مقدمه

استئوآرتریت (OA) از علل اصلی اختلال حرکتی در افراد مسن و شایع‌ترین بیماری مزمن مفصلی در جهان است (۱-۳). شیوع و بروز استئوآرتریت با افزایش سن و وزن افزایش می‌یابد و این موضوع برای سلامت عمومی بسیار نگران‌کننده است (۴). شیوع بیماری در میان زنان و مردان بین سنین ۴۰ تا ۶۰ سال افزایش می‌یابد. برآوردهای جهانی بیماری تا سال ۲۰۱۵ نشان می‌دهد که ۹٫۶٪ از مردان و ۱۸٪ از زنان ۶۰ سال یا بیشتر احتمالاً آرتروز علامت دار دارند (۴). تاکنون

نویسنده مسئول:

گروه ارتوپدی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی بم، ایران

پست الکترونیکی: Maziar.oveisee@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۶

از بافت‌های مختلف مفصل فعال شوند (۱۳). مونوسیت‌ها روند تخریب ماتریکس خارج سلولی کندروسیت‌ها را افزایش می‌دهند (۱۴) و آپوپتوز سلول‌های غضروفی را ترویج می‌کنند و در نهایت منجر به از بین رفتن غضروف می‌شوند (۱۵). بنابراین، تعیین پروفایل بیان ژن PBMC های استئوآرتريت امکان دست یابی و مطالعه در پاتوژنز مولکولی استئوآرتريت را فراهم می‌کند و ممکن است به شناسایی اهداف بهبود یافته برای درمان استئوآرتريت کمک کند (۱۶، ۱۱). در این مطالعه با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی تغییرات احتمالی پروفایل بیان ژن‌های مرتبط با بیماری OA را در سلول‌های مونوسیت خون محیطی (PBMC) بیماران مبتلا به استئوآرتريت و افراد نرمال به منظور شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مولکولی درگیر بیماری بررسی شد و به معرفی بیومارکرهاي احتمالی جدید برای شناسایی استئوآرتريت پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

### پروفایل بیانی ژنی در سلول‌های مونوسیت خون محیطی (PBMC) در افراد بیمار OA و افراد سالم

داده‌های میکروآرای سلول‌های مونوسیت خون محیطی (PBMC) مرتبط با ۱۰۶ نمونه بیمار OA و ۳۳ نمونه نرمال از پایگاه داده GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) و با شماره GSE48556 گرفته شد (یا دانلود شد). سپس این داده‌ها با استفاده از GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=>) آنالیز شد و و ژن‌های دارای تفاوت بیان با بررسی پارامترهای آماری  $adj.p.vau < 0.05$  و  $logFC \# 0.1$  جداسازی شدند.

### بررسی Gene Ontology Enrichment و مسیرها سیگنالینگ

سپس برای ژن‌های دارای بیان متمایز آنالیز عملکردی Gene Ontology (GO) و مسیر سیگنالینگ (KEGG) با استفاده از پایگاه داده Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) انجام شد. معناداری این تجزیه و تحلیل با بررسی فاکتور آماری  $P < 0.05$  و  $value <$  انجام شد.

برخی از فاکتورهای پرخطر و مستعدکننده از جمله افزایش سن (بالتر از ۵۰ سال)، چاقی یا اضافه وزن، آسیب مفاصل قبلی، نوع شغل، بعضی از انواع فعالیت‌های ورزشی، سابقه مثبت خانوادگی در ارتباط با استئوآرتريت گزارش شده اند (۳، ۵). این بیماری بیشتر مفاصل زانو، دست و لگن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تشخیص استئوآرتريت بر اساس شرح حال کامل بیمار و یافته‌های معاینه فیزیکی است، که ممکن است با یا بدون شواهد رادیوگرافی باشد (۶). شایعترین علامت استئوآرتريت، درد مزمن می‌باشد که علائم دیگر از جمله بی ثباتی مفصل، سفتی، بد شکلی مفصل و باریک شدن فضای مفصل رادیوگرافی، حساسیت به لمس، کرپیتوس و محدودیت حرکت همراه با افیوژن گاه به گاه و درجات متغیر التهاب موضعی می‌تواند در افراد درگیر نمایان شود (۴، ۳).

درمان استئوآرتريت به شکل‌های مختلف دارویی، غیردارویی، جراحی می‌باشد و در مواردی هم برای به دست آوردن نتایج مطلوب تر از ترکیب درمان‌های مختلف با هم استفاده می‌شود (۶). این درمان‌ها مجموعاً با هدف کاهش درد، کاهش سفتی، کاهش علائم و بهبود ظرفیت عملکردی و کیفیت زندگی می‌باشد (۶، ۷). جراحی و جایگزینی مفصل هم یک درمان موثر برای بیماری در مرحله پایانی و علامت دار است، اگرچه نتایج جایگزینی مفصل می‌تواند ضعیف و ناکارآمد باشد از آنجایی که طول عمر پروتزها نیز محدود است. در نتیجه، اصول اولیه درمان استئوآرتريت تمرکز بر پیشگیری از بیماری است (۸). علی‌رغم مطالعاتی که در زمینه پاتوژنز مولکولی بیماری استئوآرتريت صورت گرفته است اما همچنان مکانیسم‌های مولکولی دقیق پاتوژنز این بیماری ناشناخته است و در حال حاضر رویکرد درمانی موثری به جز جراحی تعویض کامل مفصل که به کاهش سرعت پیشرفت OA یا به تعویق انداختن تخریب غیرقابل برگشت غضروف انجام شود وجود ندارد (۳). با توجه به اطلاعات کمی که از فرآیندهای مولکولی درگیر در پاتوژنز OA وجود دارد، تشخیص زود هنگام و درمان موثر برای OA کم است. بنابراین، یکی اهداف کلیدی و مهم بیماری OA شناسایی نشانگرهای زیستی حساس می‌باشد که با توجه به دست‌یابی و در دسترس تر بودن نمونه خون محیطی شناسایی بیومارکرهاي حساس تشخیصی OA در خون محیطی برای کاربردهای بالینی بسیار ارزشمند و موثر است (۹-۱۱). ارتباط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) با بروز و پیشرفت استئوآرتريت پیش از این نشان داده شده است (۱۲). همچنین PBMC ها می‌توانند توسط فرآیند التهابی استئوآرتريت در هنگام عبور

## آنالیز آماری

معنی داری تفاوت در سطح بیان ژن های انتخاب شده از طریق  $P\text{-values} < 0.05$  به عنوان پارامتر آماری تعیین شد. همچنین  $P\text{-value} < 0.05$  از نظر آماری معنی دار در تحلیل غنی سازی عملکردی در نظر گرفته شد.

## شناسایی ژن های با بیان متفاوت در سلول های مونسیت خون محیطی (PBMC)

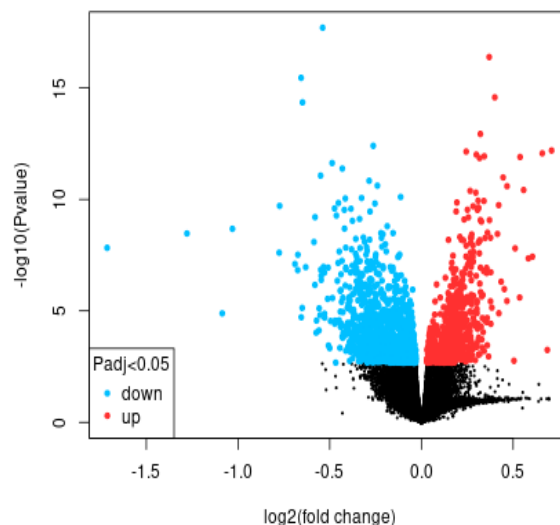
نتایج آنالیز ژن های دارای بیان متمایز داده GSE48556 (۱۰۶ نمونه بیمار OA و ۳۳ نمونه نرمال) نشان داد که ۱۵۱۵ تعداد ژن بیان متمایز دارند که از این تعداد ۶۵۷ ژن افزایش بیان و ۸۵۸ ژن کاهش بیان ( $\text{adj.p.vau} < 0.05$  و  $0.1$   $\log\text{FC}\#$ ) معنی دار را نشان دادند. همچنین نحوه ی توزیع بیان متفاوت برای هر مجموعه داده در نمودار آتشفشانی مربوطه مشخص شد (شکل ۱).

## بدست آوردن ژن های با بیشترین تغییر بیان در بیماری

در ادامه با بررسی فاکتورهای آماری  $\log\text{FC} \# 1$  و  $p\text{-adj.Value} < 0.05$  ژن دارای بیشترین تغییر بیان جهت ارائه مارکهای تشخیصی احتمالی معرفی شد. این ژنهای دارای تفاوت بیان با استفاده از GEO2R بدست آمدند که همانطور که همانطور که توضیح داده شد، در این پایگاه آنالیز، دو فاکتور  $\log\text{FC} \# 1$  و  $p\text{-adj.Value} < 0.05$  از جمله فاکتورهای بررسی ژن های دارای تفاوت بیان می باشند.

## آنالیز منحنی ROC

برای بررسی احتمال بیومارکر بودن و حساسیت و اختصاصیت ژن با بیشترین تغییر بیان با بیماری OA آنالیز منحنی ROC با استفاده از نرم افزار GraphPad\_Prism\_8.0.1 انجام شد و نمودار آن رسم شد.



شکل ۱. نمودار آتشفشانی ژن های دارای تفاوت بیان. رنگ آبی: ژن های دارای کاهش بیان و رنگ قرمز: ژن های دارای افزایش بیان. رنگ سیاه: ژن های بدون تغییر معنادار

بیولوژیکی (BP) عمدتاً در پیوند mRNA از طریق اسپلایسوزوم، پیوند RNA از طریق واکنش های ترانس استریفیکاسیون با آدنوزین برآمده به عنوان نوکلئوفیل، فرآیند کاتابولیک پروتئین وابسته به یوبی کوئیتین و پردازش mRNA نقش دارند. علاوه بر این، از نظر غنی ترین محتوای سلولی (CC)، هسته، غشای داخل سلولی/ اندامک محدود به غشاء، هسته و لومن هسته هستند (شکل ۲).

## آنالیز Gene Ontology و مسیر سیگالینگ

آنالیز GO و تحلیل مسیر KEGG با استفاده از پایگاه داده Enrichr برای ژنهای دارای تفاوت بیان انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل GO نشان داد که ژنهای دارای تفاوت بیان از نظر عملکرد مولکولی (MF) در اتصال RNA، اتصال کیناز، اتصال لیگاز پروتئینی شبه یوبیکوئیتین و فعالیت تنظیم کننده کانال کلرید نقش دارند. همچنین این ژنها از نظر فرآیندهای

**MF:**

- RNA binding (GO:0003723)
- kinase binding (GO:0019900)
- ubiquitin-like protein ligase binding (GO:0044389)
- ubiquitin protein ligase binding (GO:0031625)
- chloride channel regulator activity (GO:0017081)
- kinase activity (GO:0016301)
- large ribosomal subunit rRNA binding (GO:0070180)
- galactosyltransferase activity (GO:0008378)
- protein kinase binding (GO:0019901)
- catalytic activity, acting on a tRNA (GO:0140101)

**BP:**

- nucleus (GO:0005634)
- intracellular membrane-bounded organelle (GO:0043231)
- intracellular non-membrane-bounded organelle (GO:0043232)
- nucleolus (GO:0005730)
- nuclear lumen (GO:0031981)
- ribonucleolar lumen (GO:1904813)
- nuclear membrane (GO:0031965)
- Clathrin coat of trans-Golgi network vesicle (GO:0030130)
- MUL13A complex (GO:0044666)
- nuclear inclusion body (GO:0042405)

**CC:**

- mRNA splicing, via spliceosome (GO:000398)
- RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile (GO:000377)
- ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0006511)
- mRNA processing (GO:0006397)
- gene expression (GO:0010467)
- regulation of mRNA splicing, via spliceosome (GO:0048024)
- mRNA metabolic process (GO:0016071)
- positive regulation of proteasomal protein catabolic process (GO:1901800)
- cysteine-mediated signaling pathway (GO:0019221)
- proteasomal protein catabolic process (GO:0010498)

شکل ۲. آنالیز Gene Ontology. عملکرد مولکولی (MF)، فرآیندهای بیولوژیکی (BP)، محتوای سلولی (CC)

سیگنالینگ گیرنده سلول B، مسیرهای تخریب عصبی، پروتئولیز با واسطه یوبیکوئیتین و مسیر سیگنالینگ FoxO بیان می‌شوند (جدول ۱).

همچنین تجزیه و تحلیل مسیر KEGG نشان داد که ژن‌های دارای تفاوت بیان در ۷ مسیر از جمله پروتازوم، مسیر سیگنالینگ نوروتروفین، مسیر سیگنالینگ کموکانین، مسیر

مسیرهای سیگنالینگ	P.value	ژن‌ها
Proteasome	۰/۰۱۳۳۲	PSMA5, PSMD9, PSMB4, PSMB5, PSMC3, PSMC4, PSMC1, ADRM1, PSMC2, PSMB8
Neurotrophin signaling pathway	۰/۰۱۳۳۲	GSK3B, GAB1, FASLG, IRAK3, CALML4, NFKB1A, CDC42, RPS6KA3, TRAF6, ABL1, PLCG2, BCL2, MAPK1, BCL2, MAPK1, GRB2, RAC1, CRK, ATF4, PSMB8
Chemokine signaling pathway	۰/۰۱۳۳۲	VAV3, CX3CR1, GSK3B, CXCL8, CCL4L1, ROCK2, PPBP, CXCR6, CXCL5, NFKB1A, CDC42, CXCR3, GNB1, PLCG2, GNB4, RAC2, GNG8, MAPK1, GRB2, CCR6, RAC1, JAK3, CRK, NFKB1B
B cell receptor signaling pathway	۰/۰۲۱۵۸	VAV3, GSK3B, CD81, LILRB3, NFKB1A, INPP5D, RAC2, PLCG2, MAPK1, PTPN6, GRB2, RAC1, NFKB1B
Pathways of neurodegeneration	۰/۰۲۲۹۱	APP, GSK3B, WNT2B, CSF1, NDUFB1, FASLG, CALML4, PTGS2, C9ORF72, COX5A, UQCRH, PSMD9, ATXN3, PSMB4, TUBA3D, PSMB5, FRAT2, TUBB1, MAPK1, FADD, RAC1, NDUFV2, GPX2, XBP1, GPX1, FZD7, ADRM1, NDUFA1, TNFRSF1A, PSMA4, ATXN2L, IL6, PSMC3, PSMC4, DLG4, PSMC1, PSMC2, UQCR1, BCL2, CTNNB1, UBA1, MAPT, STX1A, ATF4
Ubiquitin mediated proteolysis	۰/۰۲۳۳۹	PIAS4, DET1, UBE3C, FBXW7, UBE2D2, UBE2E3, SIAH1, KEAP1, WWP2, UBE2Z, FZR1, ITCH, TRAF6, CDC16, MDM2, UBA1, VHL, SKP2
FoxO signaling pathway	۰/۰۲۴۵۳	CDKN2D, SMAD4, GADD45B, GADD45A, PRKAG2, IRS2, FASLG, STK4, IL6, MDM2, SIPR1, MAPK1, GRB2, SGK3, SKP2, SGK1, SIPR4

جدول ۱. مسیر سیگنالینگ ژن‌های دارای تفاوت بیان



شامل *SRSF10*، *CUEDC1*، *SRSF6* بودند و همه آنها در بیماران کاهش بیان داشتند.

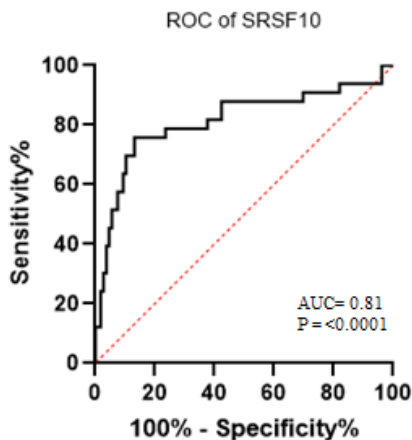
در ادامه با بررسی ژن‌های دارای بیشترین تغییر بیان از لحاظ فاکتور آماری ۱  $\log_{2}FC$  و  $\text{adj.P.Value} < 0.05$  نشان داده شده در جدول ۲ بیشترین تغییر را نشان دادند که

ID	adj.P.Val	P.Value	logFC	Gene.symbol
ILMN_2354649	./.....۸۱۵	./.....۱۴۵	-۱/۷۱	SRSF10 *
ILMN_1676665	./.....۱۲۴	./.....۱۲۹	-۱/۰۹	CUEDC1 *
ILMN_1697469	./.....۱۸۱	./.....۲۰۵	-۱/۰۳	SRSF6 *
ILMN_1770811	./.....۲۶۶	./.....۰۱۸	-۰/۷۷۲	PELO
ILMN_1683538	./.....۲۷۳	./.....۰۳۹۲	۰/۷۱	CSDE1
ILMN_1759154	./.....۲۹۳	./.....۰۷۵	-۰/۶۸۹	PABPN1
ILMN_1761120	./.....۴۶۸	./.....۱۳۷	-۰/۶۷۵	TM2D3
ILMN_2317730	./.....۲۸۶	./.....۰۷۱۲	۰/۶۵۹	ELMO2
ILMN_1786039	./.....۰۹۹۷	./.....۰۴۰۹	-۰/۶۵۶	RNF34
ILMN_2219134	./.....۱۸۹	./.....۰۱۹۱	-۰/۶۵۵	RPS15

جدول ۲. ۱۰ ژن اول حاصل از بررسی بیوانفورماتیکی دارای بیشترین تغییر بیان\*ژن‌های دارای بیشترین تغییر بیان

$\text{P.value} = 0.01$  و  $\text{Confidence interval} = 0.01 - 0.01$  را نشان داد. همچنین حساسیت این ژن  $82/81$  و اختصاصیت  $26/62$  را در  $0.01$  cut off نشان داد که می‌تواند دلیلی بر مناسب بودن ژن *SRSF10* به عنوان بیومارکر زیستی بیماری OA در سلول‌های PBMC باشد.

از بین ژن‌های معرفی شده، ژن *SRSF10* با  $\log_{2}FC = -1.71$  و  $\text{adj.P.value} = 0.00000815$  به عنوان ژنی با بیشترین تغییر مشخص شد که در بیماران کاهش بیان داشته است. در ادامه برای بررسی احتمال بیومارکری ژن *SRSF10* آنالیز منحنی ROC برای اختصاصیت و حساسیت این ژن انجام شد (شکل ۳) و نتایج بدست آمده سطح زیر منحنی  $0.81$  را با  $< 0.0001$



شکل ۳. آنالیز منحنی ROC برای ژن *SRSF10*

## بحث

و مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B اثر دارد (۲۱). در ادامه بررسی‌ها نشان داد مسیر Chemokine signaling pathway در بیماری OA اثرگذار می باشد. در این راستا Zhang FX و همکاران نشان دادند که اگزوزوم‌های آزاد شده توسط هیدروژل‌ها می توانند BMSC ها را از طریق مسیر سیگنالینگ کموکاین به هیدروژل و غضروف جدید جذب کنند و یک هیدروژل تزریقی و چسبنده برای بازسازی غضروف سطحی را شکل دهند، که در حقیقت رویکردی امیدوارکننده برای درمان نقص غضروف با کمک آرتروسکوپی می باشد (۲۲). بسیاری از کموکاین‌ها و گیرنده‌های کموکاپینی که توسط سلول‌های داخل مفصل بیان می‌شوند با پاتوژن آرتروز مرتبط هستند. وجود کموکاین‌ها ماهیت پیچیده پاسخ التهابی را در آسیب مفصل، ترمیم مفصل و استئوآرتریت نشان می دهند. افزایش سطح سرمی CXCL12 در بیماران OA توسط تعدادی از محققین مشاهده شده است و اخیراً هم نشان داده شده سطح مایع سینوویال که در ۲۵۲ بیمار اندازه‌گیری شد با شدت رادیوگرافی مرتبط بود (۲۵-۲۳).

از سویی دیگر مسیر FoxO signaling pathway یکی از مسیرهای مهم دیگر در بیماری استئوآرتریت می باشد. مطالعات نشان داده به طور خاص، از دست دادن ترکیبی FoxO1,3,4، تکثیر سلولی، تشکیل استئوکلاست و تحلیل استخوان را افزایش می‌دهد و در نهایت منجر به کاهش توده استخوانی تراکولار و قشر مغز می‌شود. سلولهای غضروفی در غضروف مفصلی انسان و موش عمدتاً FoxO1 و FoxO3 را در مقایسه با FoxO4 بیان می کنند. سطوح FoxO1 و FoxO3 هر دو با افزایش سن و با OA کاهش می‌یابند (۲۶). Akasaki (۲۷) و همکارانش نشان دادند که تغییرات در بیان FoxO ممکن است در پیری غضروف و OA نقش داشته باشد (۲۸). اما تا کنون اثر مسیرهای سیگنالینگ Pathways Ubiquitin mediated, of neurodegeneration, proteolysis و Neurotrophin signaling pathway و B cell receptor signaling pathway با بیماری استئوآرتریت مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. در مطالعه حاضر ژن *SRSF10* بیشترین کاهش بیان را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران OA نشان داد.

بررسی احتمال بیومارکری این ژن نشان‌دهنده سطح زیرمنحنی  $AUC = 0.81$  با  $P.value < 0.0001$  بود و همچنین این ژن با حساسیت و اختصاصیت بالایی  $7/49\%$  =  $cut\ off$  دارد که نشانگر احتمال قوی بودن نقش بیومارکر زیستی احتمالی این ژن برای بیماری OA در سلول‌های

با توجه به شیوع بیماری استئوآرتریت با افزایش سن در میان زنان و مردان و همچنین این نکته که این بیماری همراه با درد شدید است و باعث کاهش کیفیت زندگی و تحمیل هزینه‌های بالای مراقبت‌های بهداشتی به جامعه می شود و ناشناخته بودن پاتوژنز دقیق این بیماری (۱۷) و عدم تشخیص زودهنگام و درمان موثر برای OA بررسی مکانیسم‌های مولکولی این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از اهداف کلیدی و مهم بیماری OA شناسایی نشانگرهای زیستی حساس می‌باشد (۱۱). بدست آوردن بیومارکرهای کلیدی در بیماری‌های مفصلی از اهمیت بسیاری برخوردار است. با توجه دست یابی آسان و در دسترس بودن نمونه خون محیطی، شناسایی بیومارکرهای حساس تشخیصی OA در خون محیطی برای کاربردهای بالینی بسیار ارزشمند و موثر است. از سوی دیگر ارتباط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) با شروع و پیشرفت استئوآرتریت پیش از این نشان داده شده است (۱۹، ۱۸، ۱۲). به همین جهت هدف این پژوهش بررسی ژن‌های تغییر بیان یافته در سلول‌های PBMCs بیماران مبتلا به استئوآرتریت در مقایسه با افراد سالم به منظور درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی درگیر بیماری OA و معرفی بیومارکرهای احتمالی جدید برای این بیماری بود. از اینرو در این پژوهش با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیکی بر روی نمونه‌های PBMC نمونه‌های OA و نرمال، ژن‌های دارای تفاوت بیان بدست آمد و مشخص شد که این ژن‌ها بیشتر در مسیرهای پروتئازوم، مسیر سیگنالینگ نوروتروفین، مسیر سیگنالینگ کموکاین، مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B، مسیرهای تخریب عصبی، پروتئولیز با واسطه یوبیکوئیتین و مسیر سیگنالینگ FoxO نقش دارند. همچنین با بررسی بیشترین تغییرات بیانی و آنالیز نمودار ROC مشخص شد ژن *SRSF10* به عنوان یک بیومارکر مناسب برای بیماری استئوآرتریت معرفی شد که در بیماران کاهش بیان را نشان می‌دهد. مطالعه پیشین توسط Quan R و همکاران نشان داده شد که مهارکننده پروتئازوم MG-132 با کاهش التهاب سینوویال و محافظت از بافت غضروف مفصلی، می تواند منجر به تاخیر پیشرفت OA شود (۲۰). مطالعه Xu JF و همکاران نشان داد که سطح بیان microRNA های مایع سینوویال در بیماران استئوآرتریت تحت درمان هیالورونیک اسید تغییر می‌کند و این تغییر بر روی مسیرهای سیگنالینگ PI3K-Akt، پروتئین کیناز، فعال شده با میتوز، تنظیم اتوفاژی، مسیر نظارت mRNA،

PBMC باشد که البته با توجه به اینکه این مطالعه برای اولین بار کاهش بیان مرتبط این ژن با بیماری OA را نشان داده است. این یافته برای تایید احتمال بیومارکر بودن بایستی مورد بررسی‌های دقیق‌تر آزمایشگاهی قرار گیرد.

## نتیجه‌گیری

در نتیجه، این مطالعه با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیکی، ژنهای دارای تفاوت بیان بین بیماری OA و نمونه نرمال نشان داد ژن‌ها و مسیرهای پروتئازوم، مسیر سیگنالینگ کموکاین و مسیر سیگنالینگ FoxO در این بیماری مهم بوده و برای بدست آوردن شبکه تنظیم‌کننده‌ی مولکولی دقیق بیماری OA پیشنهاد می‌شود که برای تایید اثر مسیرها و ژن گزارش شده در این مطالعه بیان و عملکرد آنها هم به صورت آزمایشگاهی تایید شوند.

## سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت معاونت پژوهشی مرکز آموزشی تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی و دانشگاه علوم پزشکی بم برای انجام این پژوهش تشکر می‌کنند.

## منابع

1. Allen, K., L. Thoma, and Y. Golightly, *Epidemiology of osteoarthritis*. Osteoarthritis and cartilage, 2022. 30(2): p. 184-195.
2. Mandl, L., *Osteoarthritis year in review 2018: clinical*. Osteoarthritis and cartilage, 2019. 27(3): p. 359-364.
3. Xia, B., et al., *Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms*. Calcified tissue international, 2014. 95: p. 495-505.
4. Sinusas, K., *Osteoarthritis: diagnosis and treatment*. American family physician, 2012. 85(1): p. 49-56.
5. Ebell, M.H., *Osteoarthritis: rapid evidence review*. American family physician, 2018. 97(8): p. 523-526.
6. Taruc-Uy, R.L. and S.A. Lynch, *Diagnosis and treatment of osteoarthritis*. Primary Care: Clinics in Office Practice, 2013. 40(4): p. 821-836.
7. Felson, D.T., *Osteoarthritis of the knee*. New England Journal of Medicine, 2006. 354(8): p. 841-848.
8. Glyn-Jones, S. and A. Palmer, *Agricola, R.; Price, AJ; Vincent, TL; Weinans, H.; Carr. AJ Osteoarthritis*. Lancet, 2015. 386(9991): p. 376-387.
9. Malakootian, M., A. Gholipour, and M. Oveisee, *Comprehensive bioinformatics analysis of key miRNAs and signaling pathways in the body fluids of human knee osteoarthritis*. Cellular and Molecular Biology, 2023. 69(12): p. 88-97.
10. Malakootian, M., A. Gholipour, and M. Oveisee, *CD19, ALDH18A1, and CACNA1G as Significant Hub Genes in End-Stage Osteoarthritis*. Iranian Journal of Public Health, 2023. 52(12): p. 2651.
11. Shi, T., X. Shen, and G. Gao, *Gene expression profiles of peripheral blood monocytes in osteoarthritis and analysis of differentially expressed genes*. BioMed Research International, 2019. 2019.
12. Durand, M., et al., *Monocytes from patients with osteoarthritis display increased osteoclastogenesis and bone resorption: the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis study*. Arthritis & Rheumatism, 2013. 65(1): p. 148-158.
13. Attur, M., et al., *Increased interleukin-1 $\beta$  gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2011. 63(7): p. 1908-1917.
14. Castrogiovanni, P., et al., *Moderate physical activity as a prevention method for knee osteoarthritis and the role of synoviocytes as biological key*. International journal of molecular sciences, 2019. 20(3): p. 511.
15. Raghu, H., et al., *CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2017. 76(5): p. 914-922.
16. Gholipour, A., M. Malakootian, and M. Oveisee, *Biomarker role of CH25H and GYPE genes in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Tehran University of Medical Sciences Journal, 2023. 81(4): p. 288-294.
17. Abramoff, B. and F.E. Caldera, *Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options*. Medical Clinics, 2020. 104(2): p. 293-311.
18. Gholipour, A., M. Malakootian, and M. Oveisee, *hsa-miR-508-5p as a New Potential Player in Intervertebral Disc Degeneration*. International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 2022. 11(2): p. 137.
19. Malakootian, M., et al., *Potential roles of circular rnas and environmental and clinical factors in intervertebral disc degeneration*. (مجله مدیریت و مهندسی بهداشت محیط), 2022, 9(2): p. 189-200.
20. Quan, R., et al., *Effects of a proteasome inhibitor on the NF- $\kappa$ B signalling pathway in experimental osteoarthritis*. Scandinavian journal of rheumatology, 2013. 42(5): p. 400-407.
21. Xu, J.-F., et al., *Altered microRNA expression profile in synovial fluid from patients with knee osteoarthritis with treatment of hyaluronic acid*. Molecular diagnosis & therapy, 2015. 19: p. 299-308.

22. Zhang, F.-X., et al., *Injectable Mussel-Inspired highly adhesive hydrogel with exosomes for endogenous cell recruitment and cartilage defect regeneration*. *Biomaterials*, 2021. 278: p. 121169.
23. Molnar, V., et al., *Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis*. *International journal of molecular sciences*, 2021. 22(17): p. 9208.
24. Scanzello, C.R., *Chemokines and inflammation in osteoarthritis: Insights from patients and animal models*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2017. 35(4): p. 735-739.
25. Xu, Q., et al., *Association of CXCL12 levels in synovial fluid with the radiographic severity of knee osteoarthritis*. *Journal of Investigative Medicine*, 2012. 60(6): p. 898-901.
26. Bartell, S.M., et al., *FoxO proteins restrain osteoclastogenesis and bone resorption by attenuating H2O2 accumulation*. *Nature communications*, 2014. 5(1): p. 3773.
27. Calnan, D. and A. Brunet, *The foxo code*. *Oncogene*, 2008. 27(16): p. 2276-2288.
28. Akasaki, Y., et al., *Dysregulated FOXO transcription factors in articular cartilage in aging and osteoarthritis*. *Osteoarthritis and cartilage*, 2014. 22(1): p. 162-170.

