

**The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Mosul / College of Science
Chemistry Department**



**Partial Purification of Osteopontin Protein and its
Relationship to Some Biochemical Variables in The
Serum of Patients with Osteoarthritis**

Mustafa Amer Taha Altaie

M.Sc. Thesis in

Chemistry Science / Biochemistry

Supervised by

Prof. Dr. Zahraa Mohammed Ali Ahmed Hamodat

Summary

Osteopontin (OPN) is a multifunctional glycoprotein that is secreted by many cells, including bone, cartilage, and epithelial cells, and is involved in various pathological conditions, including autoimmune diseases, malignant tumors, arthritis, and the cases of stress. It can be considered a promising biomarker in the diagnosis and progression of osteoarthritis. The study includes two parts:

Part One (Clinical Study)

This part of the study focused on the clinical estimation of osteopontin levels in the serum of osteoarthritis patients and healthy people and its relationship to other relevant biochemical variables. The study commenced by collecting samples from Ibn Sina Teaching Hospital in Nineveh Governorate. the study included 150 people of both sexes, 92 of them were patients with osteoarthritis after being diagnosed by specialist doctors, 65 females and 27 males, they were divided into three groups according to the severity of the disease (mild, moderate and severe) and divided into two age groups, the first group (30-45) years and the second group (46-65) years, and the second group was chosen as a control group (58) people. Of both sexes, there were (30 females and 28 males) and they were also divided into two groups, according to age the first (30-45) and the second (46-65) years. Both patients and healthy people were also divided into three groups according to body mass index, where the first group represents normal weight, the second group represents overweight, and the third group includes people who suffer from excessive obesity.

Variables were measured, and a significant increase ($p \leq 0.0001$) in the level of osteopontin was observed in OA patients compared to healthy people. A significant increase ($p \leq 0.0001$) in the second age group (46-65) years compared to the first age group (30-45) years. A significant increase ($p \leq 0.001$) was also observed in women compared to men, as well as a significant increase in obese people compared to overweight and normal people. A significant increase was also observed in malondialdehyde, uric acid, alkaline phosphatase, creatinine,

phosphorus, and body mass index in patients compared to healthy people. On the contrary, a significant decrease in the hormone adiponin, glutathione, calcium, and magnesium was observed in patients compared to healthy people. The results also showed the relationship between osteopontin levels and biochemical variables and as well as the various stages of the disease. The relationship of osteopontin with the variables was divided according to the severity of the disease. It was noted that there is a negative significant relationship for osteopontin with each of the adiponin, glutathione, calcium, and magnesium. On the other hand, osteopontin has a positive significant relationship with malondialdehyde, uric acid, alkaline phosphatase, creatine, and urea in severe cases, and body mass index. While it was noted that there was no significant relationship for osteopontin with AST and ALT

Part Two (technical study)

This part includes the isolation and purification of osteopontin from healthy people and osteoarthritis patients. This was done using three successive techniques: precipitation with ammonium sulfate at a saturation rate of (65%), dialysis, and gel filtration chromatography, Sephadex (G-75).

Two peaks of protein were obtained in the gel filtration technique. The first band (A) has osteopontin, where the recovery rate of OPN from the serum of healthy people and OA (74.7%) and (67.2%) respectively. Also, the molecular weight of osteopontin obtained from the gel filtration technique (66000 ± 1118 Dalton), (68000 ± 1032 Dalton) for healthy people and osteoarthritis patients. The electrophoresis technique (SDS-PAGE) was also used to study the purity of peak (A) isolated by gel filtration technique and estimate its approximate molecular weight. The results showed one packet of osteopontin, and the molecular weight was (68,000 Daltons) for both healthy people and osteoarthritis patients. This is close to the molecular weight of osteopontin that we obtained from the gel filtration technique for both healthy people and patients. Molisch is used to detect the presence of carbohydrates in osteopontin.

الخلاصة

الاولستيوبونتين هو عبارة عن بروتين سكري متعدد الوظائف تفرزه العديد من الخلايا منها العظمية والغضروفية والظهارية ويشارك في حالات مرضية مختلفة بما في ذلك امراض المناعة الذاتية والاورام الخبيثة والتهاب المفاصل ويسبب بعض اشكال التوتر . ويمكن اعتباره علامة واعدة في تشخيص وتطور مرض التهاب المفاصل التنكسي. وتتكون هذه الدراسة من جزأين

الجزء الاول (دراسة سريرية)

تضمن هذا الجزء من الدراسة التقدير السريري لمستوى بروتين الاولستيوبونتين في مصل مرضى التهاب المفاصل التنكسي والاشخاص الاصحاء وعلاقتة بالمتغيرات الكيمو حيوية الاخرى. حيث بدأت الدراسة بجمع عينات الدم من مستشفى ابن سينا التعليمي في محافظة نينوى، حيث شملت الدراسة (150) شخص من كلا الجنسين كان منهم (92) شخص مريض مصاب بالتهاب المفاصل التنكسي بعد تشخيصهم من قبل اطباء متخصصين كان منهم (65 انثى و 27 ذكرا) وتم تقسيمهم الى ثلاث مجاميع استنادا الى تشخيص الطبيب المختص الى (حالة خفيفة ، متوسطة وشديدة) وتقسيمهم الى فئتين عمريتين الفئة الاولى (30-45) والفئة الثانية (46-65) سنة، والمجموعة الثانية اختيرت كمجموعة ضابطة (58) شخص من كلا الجنسين حيث شملت (30 انثى و 28 ذكرا) ومقسمين ايضا الى فئتين عمريه الاولى (30-45) والثانية (46-65) سنة . وتم تقسيم كل من المرضى والاصحاء ايضا الى ثلاث مجاميع حسب مؤشر كتلة الجسم حيث المجموعه الاولى تمثل الوزن الطبيعي والمجموعة الثانية تمثل زيادة بالوزن والمجموعة الثالثة تشمل الاشخاص الذين يعانون من السمنة المفرطة .

وعند قياس المتغيرات ، لوحظ ارتفاع معنوي ($P \leq 0.0001$) في مستوى الاولستيوبونتين في مرضى التهاب المفاصل التنكسي مقارنة بالاشخاص الاصحاء وارتفاع معنوي ($P \leq 0.0001$) في الفئة العمرية الثانية (46-65) سنة مقارنة بالفئة العمرية الاولى (30-45) سنة كما لوحظ ارتفاع معنوي ($P \leq 0.001$)

في النساء مقارنة بالرجال وكذلك ارتفاع معنوي عند البدينين مقارنة بالوزن الزائد والطبيعي. كما لوحظ ارتفاع معنوي في كل من المالونالديهايد وحامض اليوريك والفوسفاتيز القاعدي والكرياتين والفسفور ومؤشر كتلة الجسم في المرضى مقارنة بالاصحاء على العكس من ذلك حيث لوحظ انخفاض معنوي في هرمون الادروبين والكلوتاثايون والكالسيوم والمغنيسيوم في المرضى مقارنة بالاصحاء ، كما اظهرت النتائج في علاقة الاوستيوبونتين مع المتغيرات الكيموحيوية ولكونه لدينا مراحل في المرض قسمت علاقة الاوستيوبونتين مع المتغيرات حسب شدة المرض حيث لوحظ وجود علاقة سلبية معنوية للاوستيوبونتين مع كل من هرمون الادروبين والكلوتاثايون والكالسيوم والمغنيسيوم من ناحية اخرى الاوستيوبونتين علاقة معنوية ايجابية مع المالونالديهايد وحامض اليوريك والفوسفاتيز القاعدي والكرياتين واليوريا في الحالة الشديدة ومؤشر كتلة الجسم بينما لوحظ عدم وجود علاقة معنوية للاوستيوبونتين لكل من ازيمي الانين امينو ترانسفيريز واسبارتيت امينو ترانسفيريز .

الجزء الثاني (دراسة تقنية)

شمل هذا الجزء عزل وتنقية الاوستيوبونتين من الاصحاء ومرضى التهاب المفاصل التكتسي وتم ذلك باستخدام ثلاث تقنيات متتالية: الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع (65%)، الديلة وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام سيفادكس (G-75)

تم الحصول على حزمتين من البروتين في تقنية الترشيح الهلامي الذروة الاولى (أ) لديها اوستيوبونتين حيث ارتفع التركيز النوعي للاوستيوبونتين المنقى جزئيا من مصل الاشخاص الاصحاء ومرضى التهاب المفاصل التكتسي حيث وصل (5 U/mg) و(6.4 U/mg) على التوالي . كما ارتفعت عدد مرات التنقية بمقدار (19.2 folds) و (16.4 folds) على التوالي وبنسبة استرجاع (74.7%) و(67.2%) . ويلاحظ ان الوزن الجزيئي للاوستيوبونتين الذي تم الحصول عليه من تقنية الترشيح الهلامي (66000 ± 1118 Dalton)، (68000 ± 1032 Dalton) للاصحاء ومرضى

التهاب المفاصل التنكسي على التوالي. كما تم استخدام تقنية الهجرة الكهربائية (SDS-RAGE) لدراسة نقاوة القمة (أ) المعزولة بتقنية الترشيح الهلامي وتقدير وزنها الجزيئي التقريبي . حيث اظهرت النتائج حزمة واحدة من الاوستيوبونتين وكان الوزن الجزيئي (68000 دالتون) لكل من الاصحاء ومرضى التهاب المفاصل التنكسي وهذا قريب من الوزن الجزيئي للاوستيوبونتين الذي حصلنا عليه من تقنية الترشيح الهلامي لكل من الاصحاء والمرضى كما تم ايضا استخدام اختبار موليش للتأكد من وجود الكاربوهيدرات في تركيب الاوستيوبونتين.



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل/ كلية العلوم
قسم الكيمياء

تنقية جزئية لبروتين الاوستيوبونتين وعلاقته ببعض المتغيرات الكيموحيوية في مصل دم المرضى المصابين بالتهاب المفاصل التنكسي

مصطفى عامر طه الطائي

رسالة ماجستير

الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة زهراء محمد علي أحمد حمودات