

Penelitian

Analisis Proteomik Cairan Sinovial Sendi Domba: Efektivitas Metode dan Profil Protein Fungsional

Proteomic Analysis of Sheep Synovial Fluid: Method Effectivity and Protein Profiling

Kusdiantoro Mohamad^{1,2}, Wiwit Ridhani Rahmaniyah³, I Ketut Mudite Adnyane²,
Mokhammad Fahrudin², Arief Boediono^{2*}

¹Program Studi Ilmu-Ilmu Faal dan Khasiat Obat, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Dermama Proteomics Laboratory, Bethsaida Hospital, Gading Serpong, Tangerang, Banten

*Penulis untuk korespondensi: ab@apps.ipb.ac.id

Diterima 16 Januari 2020, Disetujui 3 Maret 2020

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi metode deplesi dan digesti protein, serta menganalisis proteom cairan sinovial (SF) sendi pada domba sehat menggunakan kromatografi cair–tandem spektrometri massa. Cairan SF dikoleksi dari enam ekor domba garut betina, umur ± 4 tahun, berat 35-40 kg, dan sehat secara klinis. Deplesi protein berkelimpahan tinggi dilakukan dengan metode *spin column* menggunakan TOP12 dan metode *proteospin*, sementara digesti protein dengan tiga metode, yaitu digesti *in solution*, *in gel*, dan *in-solution + filter-aided sample preparation* (FASP). Metode yang terbaik kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi peptida menggunakan *ultra performance liquid chromatography*. Metode deplesi *proteospin* dengan digesti protein *in-solution + FASP* merupakan metode terbaik berdasarkan nilai *coverage* dan *sequest HT*. Hasil analisis proteomik terkarakterisasi 52 protein pada *database* spesies domba. Anotasi gen ontologi menggunakan *DAVID analysis* menunjukkan bahwa protein-protein SF tersebut merupakan komponen sel terutama sebagai eksosom ekstraseluler, fungsi molekuler sebagai aktivitas inhibitor endopeptidase tipe-serin dan pengikat ion kalsium; serta proses biologis sebagai angiogenesis dan koagulasi darah atau pembentukan fibrin. Analisis *KEGG pathway* menunjukkan protein SF berperan utama pada jalur kaskade koagulasi dan komplemen.

Kata kunci: cairan sinovial, domba, LC-MS/MS, profil protein, sendi

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the protein depletion and digestion methods, and analyze the synovial fluid (SF) proteom from the joints of healthy sheep using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. The SF liquid was collected from six female Garut sheep with ± 4 years old, 35-40 kg of body weights, and clinically healthy. Abundance protein depletion was performed by the spin column using TOP 12 method and the proteospin method, and protein digestion by three methods, namely in-gel, in-solution, and in-solution + filter-aided sample preparation (FASP). The best method was continued with peptide fractionation using ultra performance liquid chromatography. Proteospin with in-solution digestion + FASP was the best method for protein depletion and digestion based on coverage and sequest HT values. Proteomic analysis yielded 52 proteins which were characterized based on sheep species database. Gene ontology annotation using DAVID analysis showed that the SF proteins were the main cell component as extracellular exosomes; the main molecular function as serine-type endopeptidase inhibitor activity and calcium ion binding; and the main biological processes as angiogenesis and blood coagulation or fibrin clot formation. KEGG pathway analysis showed that the main pathway of SF proteins was in coagulation and complement cascades.

Keywords: synovial fluid, sheep, LC-MS/MS, protein profiling, joint

PENDAHULUAN

Cairan sinovial (*sinovial fluids*, SF) sendi merupakan cairan yang bersifat *viscous* yang berfungsi sebagai pelumas (*lubricant*), penyedia dan transfer nutrisi dan sitokin untuk jaringan-jaringan lain seperti sinovium, tulang rawan sendi, dan jaringan tulang di sendi (Blewis *et al.*, 2007). Cairan SF mengandung molekul-molekul yang berperan dalam mengurangi friksi dan perlukaan akibat gesekan pada saat pergerakan sendi. Komponen utama yang terdapat dalam SF yang bertindak sebagai pelumas diantaranya ialah asam hialuronat, lubricin, dan fosfolipid permukaan (Kosinska *et al.*, 2015).

Analisis protein berbasis spektrometri massa merupakan salah satu metode yang cepat dan sensitif untuk berbagai keperluan. Salah satu spektrometri massa yang dapat digunakan untuk analisis proteomik SF ialah kromatografi cair-tandem spektrometri massa (LC-MS/MS). Analisis proteomik berbasis spektrometri massa pada cairan sinovial sendi dapat dilakukan untuk keperluan identifikasi biomarker dan patogenesis penyakit pada sendi (Liao *et al.*, 2015). Meskipun demikian, analisis proteomik pada SF memiliki beberapa kendala, yaitu kadar protein SF yang bersifat dinamis, dan seperti kondisi pada protein serum atau plasma, pada SF terdapat protein berkelimpahan tinggi yang bisa menutupi protein-protein berkonsentrasi rendah yang akan dituju sebagai biomarker (Peffer *et al.*, 2019). Oleh karena sifat SF yang demikian itu, maka di dalam melakukan analisis, proses optimasi dari metode deplesi, digesti, dan fraksinasi menjadi penting.

Deplesi protein berkelimpahan tinggi bisa dilakukan menggunakan metode berbasis afinitas antibodi spesifik (Tu *et al.*, 2010) dan penukar ion (Filip *et al.*, 2015). Deplesi berbasis afinitas imunologis seperti TOP 12 sementara deplesi berbasis pertukaran ion seperti proteospin. Digesti protein bisa menggunakan digesti *in solution* atau *in gel* dengan menggunakan preparasi *filter-aided sample preparation* (FASP) (Wiśniewski *et al.*, 2009). Sebelum digesti *in gel*, protein dipisahkan berdasarkan berat molekul dengan *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE), kemudian protein yang diinginkan dapat dianalisis lebih lanjut. Metode FASP sendiri berfungsi untuk menghilangkan kelebihan detergen pada campuran protein sehingga akan meningkatkan perolehan hasil analisis (Potriquet *et al.*, 2017).

Penelitian proteomik cairan sinovial sendi banyak dilaporkan pada manusia (Balakrishnan *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015; Peffer *et al.*, 2019). Pada hewan besar, penelitian proteomik telah dilaporkan pada

kuda, anjing, dan babi (Skiöldebrand *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2017; Bennike, 2014), tetapi belum pernah dilaporkan pada domba. Domba merupakan salah satu hewan yang banyak digunakan sebagai hewan model dalam penelitian penyakit sendi seperti osteoarthritis (OA) pada manusia (Music *et al.*, 2018; Cope *et al.*, 2019). Meskipun domba merupakan salah satu hewan yang banyak digunakan sebagai hewan model dalam penelitian tulang rawan dan penyakit sendi, namun sejauh ini analisis proteomik cairan sinovial pada domba belum pernah dilaporkan. Selain itu, belum tersedia antibodi untuk metode deplesi protein berkelimpahan tinggi pada spesies domba merupakan salah satu faktor yang bisa membatasi aplikasi analisis proteomik SF pada spesies ini.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis metode deplesi dan digesti protein yang efektif untuk kromatografi cair-tandem spektrometri massa, serta menganalisis ontologi gen dari protein-protein yang berhasil diidentifikasi pada cairan sinovial sendi pada domba sehat. Dari hasil analisis protein SF ini, diharapkan dapat diketahui protein-protein yang berperan dalam fungsi sendi pada domba, sehingga penggunaan domba sebagai hewan model untuk penyakit-penyakit sendi pada hewan kesayangan maupun pada manusia dapat semakin berkembang.

BAHAN DAN METODE

Etik Penelitian dan Hewan Coba

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Hewan, Rumah Sakit Hewan Pendidikan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (RSHP FKH IPB) dengan No. 8-2016. Penelitian menggunakan enam ekor domba garut betina dengan perkiraan umur ± 4 tahun, berat badan 35-40 kg, dan dinyatakan sehat oleh dokter hewan. Domba terlebih dahulu diaklimatisasi selama dua minggu, dipelihara dan diperlakukan sesuai dengan standar kesejahteraan hewan. Domba diberi pakan hijauan dua kali sehari, pakan konsentrat satu kali sehari, dan air minum *ad libitum*.

Koleksi Cairan Sinovial Sendi

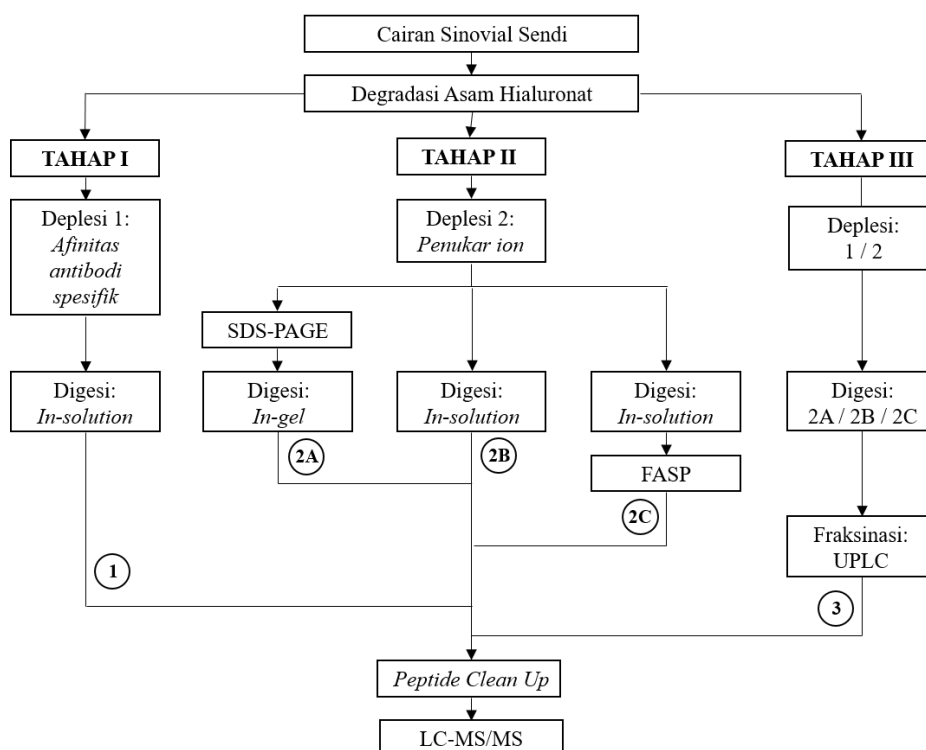
Koleksi cairan sinovial dilakukan dengan prosedur bedah pada sendi tibiofemoralis kaki belakang kiri. Domba terlebih dahulu diberi pramedikasi berupa atropin 0.06 mg/kg berat badan (BB) secara subkutan, kemudian diberi anestesi umum menggunakan kombinasi ketamin 11 mg/kg BB dan xylazin 0.22 mg/kg BB secara intramuscular (IM).

Rambut di daerah sekitar sendi femorotibialis dicukur, diolesi antiseptik, kemudian cairan sendi dikoleksi menggunakan spuit 5 mL. Selanjutnya cairan sendi dimasukkan ke dalam tabung steril 2 mL dan disimpan sementara pada suhu 4 °C. Pasca bedah, domba diberi oksitetrasiklin 1 mg/kg BB IM sekali sehari, selama tiga hari secara berturut-turut. Pengamatan proses persembuhan dilakukan selama satu minggu pascakoleksi. Cairan sinovial hasil koleksi disentrifugasi dengan kecepatan 1500 g pada suhu 4 °C selama 15 menit (Balakrishnan et al., 2014), supernatan dikoleksi dan disimpan pada suhu -80 °C hingga proses analisis selanjutnya. Pada saat akan digunakan, masing-masing dari ke-6 sampel tersebut diambil sebanyak 50 µL dan digabung untuk keperluan analisis protein.

Alur Penelitian

Prosedur analisis proteomik melalui beberapa tahapan, yaitu proses degradasi asam hialuronat (HA), deplesi protein berkelimpahan tinggi, digesi protein, fraksinasi peptida, dan analisis spektrometri

massa. Degradasi HA akan melepas protein-protein yang berikatan dengan hialuronan sehingga akan meningkatkan hasil analisis. Protein berkelimpahan tinggi terlebih dahulu dihilangkan agar tidak menutupi protein lain yang lebih sedikit konsentrasinya pada saat dianalisis spektrometri. Pada penelitian ini, degradasi HA menggunakan enzim hialuronidase, sedangkan deplesi dan digesi protein dilakukan melalui tiga tahapan untuk memperoleh hasil optimal dari analisis jenis protein menggunakan LC-MS/MS (Gambar 1). Tahap pertama, deplesi protein berkelimpahan tinggi dilakukan dengan metode afinitas antibodi spesifik dan dilanjutkan dengan digesi *in-solution*. Tahap kedua, dilakukan deplesi dengan metode penukar ion dan dilanjutkan dengan digesi protein menjadi peptida dengan menggunakan tiga metode, yaitu digesi *in solution*, *in gel*, dan *in-solution* dilanjutkan dengan *filter-aided sample preparation (in-solution + FASP)*. Pada tahap akhir, metode terbaik dari deplesi dan digesi dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan *ultra performance liquid chromatography (UPLC)*.



Gambar 1 Alur penelitian analisis protein menggunakan *liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)* dengan tiga tahapan, pertama: deplesi protein menggunakan metode afinitas antibodi spesifik; kedua: deplesi menggunakan metode penukar ion dengan digesi *in-gel*, *in-solution*, dan *in-solution + filter-aided sample preparation (FASP)*; serta ketiga: metode deplesi dan digesi terbaik kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi dengan *ultra performance liquid chromatography (UPLC)*

Pengukuran Kadar Protein

Analisis protein diawali dengan pengukuran kadar protein dalam sampel. Pengukuran kadar protein dilakukan agar jumlah protein yang dianalisis dapat dikalkulasi. Kadar protein diukur pada 3 keadaan, yaitu sebelum degradasi asam hialuronat, setelah degradasi asam hialuronat, dan setelah depleksi. Pemeriksaan konsentrasi protein dilakukan menggunakan metode Bradford mengikuti prosedur dari *User Guide Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Singapura)*. Data yang dihasilkan dianalisis dengan software Thermo ScanIt RE For Multiskan Go Software versi 3.2.

Degradasi Asam Hialuronat

Sebanyak 1 µL hyaluronidase (Sigma, USA) dengan konsentrasi 1 mg/mL direaksikan ke dalam 1 mL sampel, sehingga konsentrasi akhir dari Hyaluronidase adalah 1 µg/mL (Mateos et al. 2012), diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam, dan disentrifugasi pada kecepatan 1.000 g selama 5 menit. Supernatan disaring menggunakan filter 0.22 µm untuk menghilangkan partikel-partikel yang tidak terlarut. Filtrat yang diperoleh ditempatkan pada tabung mikro dan disimpan pada suhu -80 °C hingga proses analisis selanjutnya.

Depleksi Protein dengan Spin Column dan ProteoSpin

Depleksi dilakukan dengan dua metode yaitu afinitas antibodi spesifik menggunakan *Pierce™ Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, Singapura)* dan metode penukar ion menggunakan *ProteoSpin™ Abundant Serum Protein Depletion Kit (Norgen Biotek Corp., Kanada)*. Metode afinitas antibodi spesifik menghilangkan 12 jenis protein berkelimpahan tinggi, yaitu α1-acid glycoprotein, fibrinogen, α1-antitrypsin, haptoglobin, α2-macroglobulin, IgA, albumin, IgG, apolipoprotein A-I, IgM, apolipoprotein A-II, dan transferrin. Depleksi dengan metode penukar ion mengurangi protein-protein kelimpahan tinggi termasuk albumin, alfa-antitripsin, transferrin, dan haptoglobin. Sebanyak 500 µg sampel, didepleksi dengan menggunakan kit TOP 12 dan kit ProteoSpin dengan prosedur sesuai yang direkomendasikan oleh masing-masing produk.

SDS-PAGE

Pemisahan protein dilakukan menggunakan gel poliakrilamida 12% yang mengandung sodium dodecyl sulfate. Masing-masing sebanyak 5 µg sampel dan protein standar BSA dijalankan pada gel elektroforesis. Marka protein standar yang digunakan

adalah *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific, Singapura)* sebanyak 5 µL.

Digesi Protein in Solution dan in Gel

Sampel protein hasil depleksi yang telah ditentukan konsentrasinya, dipreparasi menjadi peptida sebelum dilakukan analisis LC – MS/MS. Preparasi terdiri dari tahap reduksi, alkilasi dan digesi. Sebanyak 10 µg protein dipreparasi untuk memotong protein menjadi peptida menggunakan metode digesi *in-solution* sesuai dengan *manual instruction in-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit (Thermo Fisher Scientific, Singapura)*. Digesi *in-gel* dilakukan pada daerah yang mengandung pita protein dari hasil SDS-PAGE yang dipotong secara vertikal, kemudian potongan diperkecil hingga ukuran sekitar 2x2 mm. Selanjutnya potongan gel dipreparasi menjadi peptida dan diekstraksi. Proses preparasi terdiri dari tahap reduksi, alkilasi, digesi, dan ekstraksi peptida. Proses preparasi dilakukan sesuai dengan instruksi dari *In-Gel Tryptic Digestion Kit (Thermo Fisher Scientific)* yang telah dimodifikasi.

Preparasi Sampel dengan Metode FASP

Sebanyak 61,5 µg sampel (hasil depleksi dengan metode penukar ion) dipreparasi dengan metode FASP sesuai dengan protokol dari Wisniewski (2017). Sampel dipreparasi di dalam *Amicon Ultra Centrifugal Filters 10 kDa*. Sampel dicuci dengan larutan urea 8 M untuk menghilangkan *Elution Buffer C* dari *ProteoSpin™ Abundant Serum Protein Depletion Kit (Norgen Biotek Corp., Kanada)* dan untuk mendenaturasi protein. Sampel direduksi dengan 10 mM DTT lalu dialkilasi dengan 50 mM IAA. Sebelum didigesi dengan trypsin 3050 ng selama 2 jam, sampel terlebih dahulu dicuci dengan urea dan 50 mM TEAB untuk mengondisikan sampel pada pH 7,8. Peptida hasil digesi ditampung dan filter dibilas dengan 70% ACN, 0.1% formic acid supaya semua peptida hasil digesi telah melewati filter. Seluruh peptida hasil digesi dikeringkan dengan *vacuum concentrator*.

Fraksinasi Peptida dengan UPLC

Sebanyak 30,75 µg peptida difraksinasi dengan kolom *strong cation exchange (SCX) PolySULFOETHYL A 100x2,1-mm; 5 µm, 300 Å (PolyLC Inc., USA)* pada instrumen *Acquity UPLC H-Class (Waters, USA)*. Fasa gerak yang digunakan pada pemisahan secara gradien yaitu pelarut A yang terdiri atas asetonitril-diamonium hidrogen fosfat (20:80 w/w) dan pelarut B yang terdiri atas asetonitril-diamonium hidrogen fosfat-natrium klorida (60:40 w/w, 500mM) dengan laju alir 0,2 mL/menit dan waktu gradien 10–37 menit 0–100% B. Fraksi yang ditampung adalah sebanyak 39 fraksi.

Peptide Cleanup

Peptida hasil digesi dan hasil fraksinasi dengan UPLC dibersihkan dari pengotor, seperti garam, menggunakan Pierce™ C18 Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, USA). Protokol pengerjaan dilakukan sesuai dengan User Guide Thermo C18 Spin Columns. Sampel yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan dengan *vacuum concentrator* selama 2 jam.

Analisis LC-MS/MS

Analisis LC-MS/MS menggunakan instrumen *Ultimate 3000 RSLC nano System and Q Exactive* (Thermo Fisher Scientific). Sampel yang telah dikeringkan dilarutkan dengan 50 µL *dissolving solution* yang mengandung 2% *acetonitrile* dan 0,1% *formic acid*. Volume injeksi yang digunakan adalah sebanyak 2,5 µL (500 ng) peptida dengan kolumn *reverse phase* *PepMap RSLC 75 µm × 25 cm (C18, 2 µm, 100 Å)* (Thermo Fisher Scientific), dan laju (*flow rate*) 300 nL/min. Data luaran dari LC-MS/MS dianalisis menggunakan *software Proteome Discoverer 2.1* (Thermo Scientific, USA) dengan *search engine Sequest HT* untuk identifikasi protein berdasarkan *database* dari <http://www.uniprot.org> untuk spesies *Ovis aries* (TaxonomyID: 9940). Enzim yang digunakan adalah tripsin (memecah C-terminal untuk Lys dan Arg) dengan *maximum missed cleavage* 2. Modifikasi yang diizinkan adalah asetil untuk N-terminal, oksidasi untuk asam amino Met, dan *carbamidomethyl* untuk asam amino Cys.

Analisis Data

Anotasi setiap jenis protein untuk menganalisis fungsi protein dilakukan menggunakan program *InterPro* ver. 76.0 pada situs <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>. Analisis anotasi fungsional menggunakan program *Functional Annotation Tool* dari perangkat lunak *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* (<https://david.ncifcrf.gov/>), terdiri atas: kategori fungsional (*functional categories*), ontologi gen (*gene ontology, GO*), dan jalur mekanisme (*pathways*).

Kategori fungsional diambil dari hasil UP_KEYWORDS (merujuk kepada <https://www.uniprot.org/>); ontologi gen diambil dari hasil GOTERM_MF_DIRECT, GOTERM_BP_DIRECT, dan GOTERM_CC_DIRECT berturut-turut untuk fungsi molekular, proses biologis, dan komponen sel (merujuk kepada <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>); serta jalur mekanisme diambil dari hasil KEGG_PATHWAY

(merujuk ke <https://www.kegg.jp/>). Data yang disajikan dalam bentuk diagram venn diolah dengan menggunakan program *Venn Diagram Plotter* yang dapat diunduh di <https://omics.pnl.gov/software/venn-diagram-plotter>.

HASIL

Kadar Protein setelah Degradasi dan Depleksi

Kandungan asam hialuronat (HA) dan protein berkelimpahan tinggi pada cairan sinovial sendi berturut-turut dihilangkan dengan cara didegradasi dengan enzim hialuronidase dan didepleksi protein menggunakan kit depleksi. Kadar protein sebelum, setelah degradasi HA, dan setelah depleksi berturut-turut 20,27 ± 7,97; 13,3 ± 0,46; dan 0,45 ± 0,15 mg/mL (Tabel 1). Penurunan kadar protein setelah degradasi HA disebabkan oleh proses pengenceran saat proses degradasi. Oleh karena itu pengukuran kembali kadar protein diperlukan untuk menentukan kadar protein untuk proses selanjutnya. Sementara itu, protein berkelimpahan tinggi yang tertahan di dalam kolom depleksi sebesar 409,7 ± 29,4 µg atau 81,9 5,9 % dari total 500 µg protein yang didepleksi. Proses depleksi mampu menghilangkan sebagian besar protein berkelimpahan tinggi juga terkonfirmasi oleh hasil SDS-PAGE (Gambar 2A).

Efektivitas Depleksi Protein

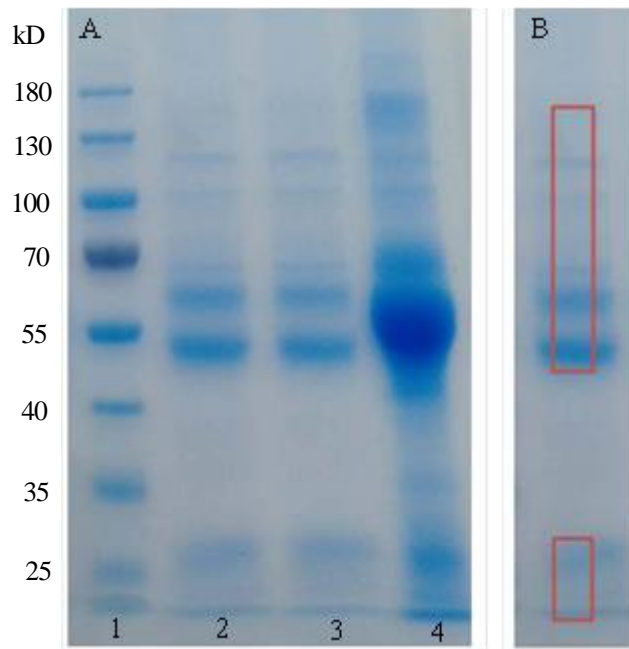
Depleksi protein berkelimpahan tinggi pada tahap awal menggunakan metode *afinitas antibodi spesifik* (Metode 1) yang biasa digunakan untuk depleksi protein manusia. Hasil analisis LC-MS menunjukkan sebanyak 15 jenis protein teridentifikasi, dengan protein berkelimpahan tinggi seperti albumin dan transferin masih terdeteksi dengan jumlah yang cukup banyak. Jumlah yang banyak ini dapat dilihat dari nilai *coverage* dan *sequest HT* yang tinggi. Jumlah protein albumin dan transferin yang masih tinggi ini masih menutupi protein-protein lain yang memiliki kadar yang lebih sedikit, sehingga jumlah protein teridentifikasinya masih sedikit (15 jenis protein). Hasil ini menunjukkan depleksi dengan metode afinitas antibodi spesifik yang biasa digunakan untuk protein manusia tidak efektif untuk cairan sinovial sendi domba.

Depleksi dengan metode penukar ion dilakukan berdasarkan mekanisme pertukaran ion sehingga tidak spesies spesifik sebagaimana halnya dengan depleksi menggunakan antibodi seperti pada kit TOP-12 yang memang untuk analisis serum manusia. Sampel hasil depleksi dengan metode penukar ion dipreparasi

Tabel 1 Kadar protein sebelum degradasi asam hialuronat (HA), setelah degradasi HA, dan setelah depleksi protein berkelimpahan tinggi

Jenis Pengukuran	Kadar protein	Persentase
Total protein (a)	20.3 ± 8.0 mg/mL	-
Pascadegradasi HA (b)	1.3 ± 0.1 mg/mL	-
Penurunan protein (b-a)	18.9 ± 7.9 mg/mL	92.8 ± 5.9 %
Pascadepleksi (c)	451.7 ± 147.0 µg/mL	-
Protein yang terdepleksi [#]	409.7 ± 29.4 µg	81.9 ± 5.9 %

[#] dari 500 µg sampel yang didepleksi [500 µg - (c × 0.2 mL)]



Gambar 2 Hasil SDS-PAGE dari depleksi protein dengan metode proteospin. A. Lajur 1: Protein marker, Lajur 2 dan 3: sampel setelah depleksi, Lajur 4: sampel sebelum depleksi. B. Daerah pemotongan untuk digesi metode *in-gel*

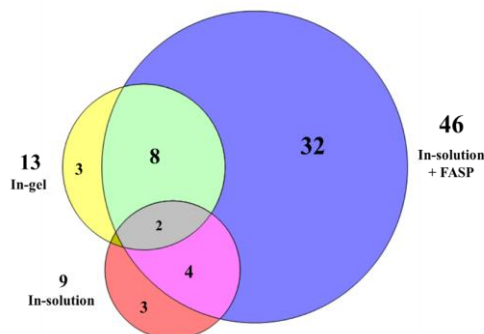
untuk menghasilkan peptida dengan tiga metode, yaitu *in-gel* (Metode 2A), *in-solution* (metode 2B), dan *in-solution* yang dilanjutkan dengan FASP (Metode 2C). Digesti *in-gel* menggunakan potongan dari hasil SDS-PAGE dengan daerah yang dipotong seperti pada Gambar 2B. Hasil menunjukkan metode digesti *in-solution* lebih sedikit protein (9 protein) yang teridentifikasi dibandingkan dengan *in-gel* (13 protein), tetapi dengan lanjutan prosedur FASP (46 protein) mampu meningkatkan jumlah protein teridentifikasi (Gambar 3).

Dari ketiga metode digesti terdapat dua protein yang sama-sama teridentifikasi pada ketiga metode tersebut, yaitu protein dengan kode W5NPK5 dan W5NRI1 (Tabel 2). Untuk itu, perbandingan efektifitas dari ketiga metode digesti dibuat dengan menggunakan kedua jenis protein ini. Hasil nilai *coverage* dan *score* Sequest HT pada kedua protein

tersebut menunjukkan nilai terbaik ketika menggunakan metode 2C (*in solution* + FASP) dibanding metode 2A dan 2B. Nilai *coverage* dan *score* *sequest HT* yang tinggi menunjukkan tingkat kelimpahan dan kesesuaian protein teridentifikasi dengan protein yang terdapat pada *data base* yang paling baik pada metode 2C.

Efektivitas Fraksinasi dengan UPLC

Pada Metode 3 (Metode 2C + fraksinasi UPLC), digesti protein menggunakan Metode 2C dan dilanjutkan dengan fraksinasi peptida dengan kolom *strong cation exchange* (SCX) menggunakan *ultra performance liquid chromatography* (UPLC). Metode SCX pada UPLC dapat meningkatkan *sequence coverage*, protein dan peptida teridentifikasi pada analisis proteomik (Mostovenko et al. 2013). Jumlah protein yang teridentifikasi dan terkarakterisasi pada



Gambar 3 Perbandingan jumlah protein yang teridentifikasi antara metode digesi *in-gel*, *in-solution*, serta *in-solution* yang dilanjutkan dengan *filter-aided sample preparation* (FASP)

Tabel 2 Perbedaan coverage dan score sequest HT pada dua jenis protein yang sama-sama teridentifikasi pada digesi *in-gel*, *in-solution*, dan *in-solution* + FASP

Kode Protein	Metode Digesi	Coverage	Score Seq HT
W5NPK5	In-gel	22	55
	In-solution	3	10
	In-solution + FASP	59	134
W5NRI1	In-gel	26	58
	In-solution	4	15
	In-solution + FASP	64	269

Tabel 3 Protein yang teridentifikasi pada masing-masing metode optimasi

Protein	Metode					Total
	1	2A	2B	2C	3	
Protein terkarakterisasi	9	6	4	29	63	67
Protein tidak terkarakterisasi	6	7	5	17	31	33
Total protein teridentifikasi	15	13	9	46	94	100

Metode 1, 2A, 2B, 2C, dan 3 dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil menunjukkan Metode 3 menghasilkan jumlah protein yang terkarakterisasi lebih tinggi dibandingkan metode tanpa fraksinasi UPLC. Metode 3 menghasilkan sebanyak 96 jenis protein yang teridentifikasi, dan jika ditambah dengan *alpha-1-acid glycoprotein* (Metode 1), *beta-K globin chain* (Metode 1 dan 2A), *fibrinogen beta chain* (Metode 2B), dan *hemoglobin subunit beta* (Metode 2C), maka diperoleh total 100 jenis protein yang teridentifikasi pada seluruh metode (Tabel 3). Dengan demikian, hampir semua protein yang teridentifikasi pada Metode 1, 2A, 2B, dan 2C juga teridentifikasi pada Metode 3.

Berdasarkan *database* yang tersedia, dari 100 total protein (96 protein dari Metode 3 ditambah 4 protein dari Metode 1, 2A-C) maka sebanyak 67 protein (68%) berhasil terkarakterisasi berdasarkan *database* spesies *Ovis aries*, sedangkan sebanyak 33 protein (32%) belum terkarakterisasi (Tabel 3). Protein yang tidak terkarakterisasi adalah protein yang telah ditentukan urutan asam aminonya namun belum diki-

tahui fungsinya atau fungsi protein tersebut belum tervalidasi. Protein keratin, yaitu keratin 10 dan keratin 1, dan protein sel darah merah, yaitu *II alpha globin*, *beta-A globin chain*, *beta-K globin chain*, dan *hemoglobin sub unit beta*, diduga sebagai kontaminasi pada saat penyedotan cairan sinovial dengan spuit (Gobezie et al., 2007), sehingga dikeluarkan dari daftar protein yang akan dianalisis. Sementara itu, apolipoprotein A1 (fragmen) juga dikeluarkan dari daftar karena sudah ada apolipoprotein A1 yang lengkap. Sementara protein (fragmen) yang lain tetap dicantumkan untuk analisa. Protein yang terkarakterisasi setelah penyotiran di atas dan dengan nilai peptida unik ≥ 2 , serta pencocokan fungsional gennya, maka diperoleh 52 protein yang disajikan selengkapnya pada Tabel 4.

Analisis Ontologi Gen

Analisis ontologi gen (*gene ontology*, GO) dari ke-52 protein yang terkarakterisasi menunjukkan komponen sel yang dominan sebagai eksosom ekstraseluler (37%), partikel darah (23%), dan pengisi

ruang ekstraseluler (18%) (Gambar 4A), serta kategori fungsional yang dominan sebagai signal (38%), ikatan disulfida (18%), dan sekreta (14%) (Gambar 4B). Masing-masing protein yang terlibat ialah sebanyak 42, 26, dan 21 berurutan untuk eksosom ekstraseluler, partikel darah, dan pengisi ruang ekstraseluler, serta sebanyak 43, 20, dan 16 protein berurutan sebagai signal, ikatan disulfida, dan sekreta. Pada fungsi molekuler, protein yang terkarakterisasi mendominasi fungsi sebagai aktivitas inhibitor endopeptidase tipe serin (22%), ikatan ion kalsium (17%), aktivitas inhibitor endopeptidase tipe sistein (10%), ikatan heparin (10%), dan aktivitas endopeptidase tipe-serin (10%) (Gambar 4C). Sementara itu, protein terkarakterisasi yang berfungsi dalam proses biologis mendominasi proses angiogenesis (12%), koagulasi darah atau pembentukan fibrin (12%), dan respon imunitas (8%) (Gambar 4D). Analisis KEGG *pathway* menunjukkan terdapat 10 *pathway* yang teridentifikasi dimana lima diantaranya berperan dalam fungsi cairan sinovial sendi (Gambar 5). *Complement and coagulation cascade* merupakan *pathway* yang paling dominan, yaitu melibatkan sebanyak 19 protein/gen (33%).

PEMBAHASAN

Kadar total protein dari cairan sinovial sendi pada penelitian ini sebesar 20.3 ± 8.0 mg/mL (Tabel 1) atau setara dengan 2.03 ± 0.80 g/dL, serupa dengan yang dilaporkan pada domba sehat, yakni sebesar 2.31 ± 0.55 g/dL (Ameri & Gharib, 2005). Kadar protein pada domba penelitian menunjukkan nilai yang serupa de-

ngan nilai pada manusia, yaitu sebesar 15-25 mg/mL (Mazzucco *et al.*, 2004). Kadar protein cairan sinovial menunjukkan peningkatan pada kejadian peradangan sendi, baik pada hewan (Rohde *et al.*, 2000; Nazaal *et al.*, 2005) maupun pada manusia (Mazzucco *et al.*, 2004).

Perlakuan degradasi secara enzimatik menggunakan enzim hialuronidase berfungsi untuk menghidrolisis HA. Asam hialuronat merupakan jenis polisakarida dan menjadi salah satu komponen utama dalam cairan sendi (Kosinska *et al.*, 2015). Kadar HA pada sendi telah dilaporkan pada domba sebesar 0.54 mg/mL (Fraser *et al.* 1993), dan pada manusia sebesar 1-4 mg/mL (Mazzucco *et al.* 2004). Degradasi enzimatik dengan hialuronidase akan membebaskan protein-protein yang berikatan dengan HA. Kelompok protein-protein yang berikatan dengan HA dikenal sebagai hyaladherin dan berperan pada banyak fungsi tubuh, seperti pada tulang rawan sendi, elastisitas pembuluh darah, dan protein-protein struktural pada berbagai jaringan tubuh (Day & Prestwich, 2002). Proses pembebasan protein dari ikatannya dengan HA diperlukan agar protein yang terdeteksi pada analisis LC-MS/MS selanjutnya akan semakin banyak.

Metode proteospin menunjukkan efektifitas yang lebih tinggi ketika digunakan untuk spesies domba (*Ovis aries*). Perlakuan depleksi dengan menggunakan metode penukar ion mampu mengurangi atau menurunkan kadar protein berkelebihan tinggi sebesar $81,9 \pm 5,9$ % (Tabel 1). Beberapa protein berkelebihan tinggi, diantaranya

Tabel 4 Protein yang terkarakterisasi menggunakan metode LC-MS/MS pada cairan sinovial sendi domba

Nama Protein (Gen)	Kode Akses	Peptida Unik	Berat Molekul (kD)	Coverage	Score Seq HT
Serotransferrin (TF)	W5PF65	16	77,29	29,26	36,21
Serpin family C member 1 (SERPINC1)	P32262	15	52,47	36,13	50,02
Plasminogen (PLG)	W5P3R3	15	91,12	29,17	55,59
Ceruloplasmin (CP)	W5P4S0	15	120,57	19,98	55,41
GC, vitamin D binding protein (GC)	W5PTH1	14	53,35	36,76	42,36
Hemopexin (HPX)	W5QAB1	14	51,90	39,57	94,46
Apolipoprotein A-I (APOA1)	W5NX51	13	29,51	47,49	71,58
Gelsolin (GSN)	W5P627	13	85,67	27,75	36,53
Fibronectin 1 (FN1)	W5QDG7	13	271,88	7,99	29,22
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 4 (ITIH4)	W5NRG7	12	101,75	18,97	25,61
Complement C2 (C2)	W5NY95	12	138,31	13,34	41,67
Apolipoprotein A4 (APOA4)	W5NWM2	9	41,46	27,84	31,63
Coagulation factor II, thrombin (F2)	W5P1L7	9	74,50	16,67	14,23
Complement C5 (C5)	W5P6F4	9	188,81	8,21	29,28
Serpin family F member 1 (SERPINF1)	B6UV62	8	45,93	25,72	19,55
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2 (ITIH2)	W5PW21	8	105,91	13,53	23,5
Apolipoprotein H (APOH)	W5Q268	8	38,13	36,52	42,31
Kininogen 1 (KNG1)	W5QH45	8	48,66	24,08	21,54

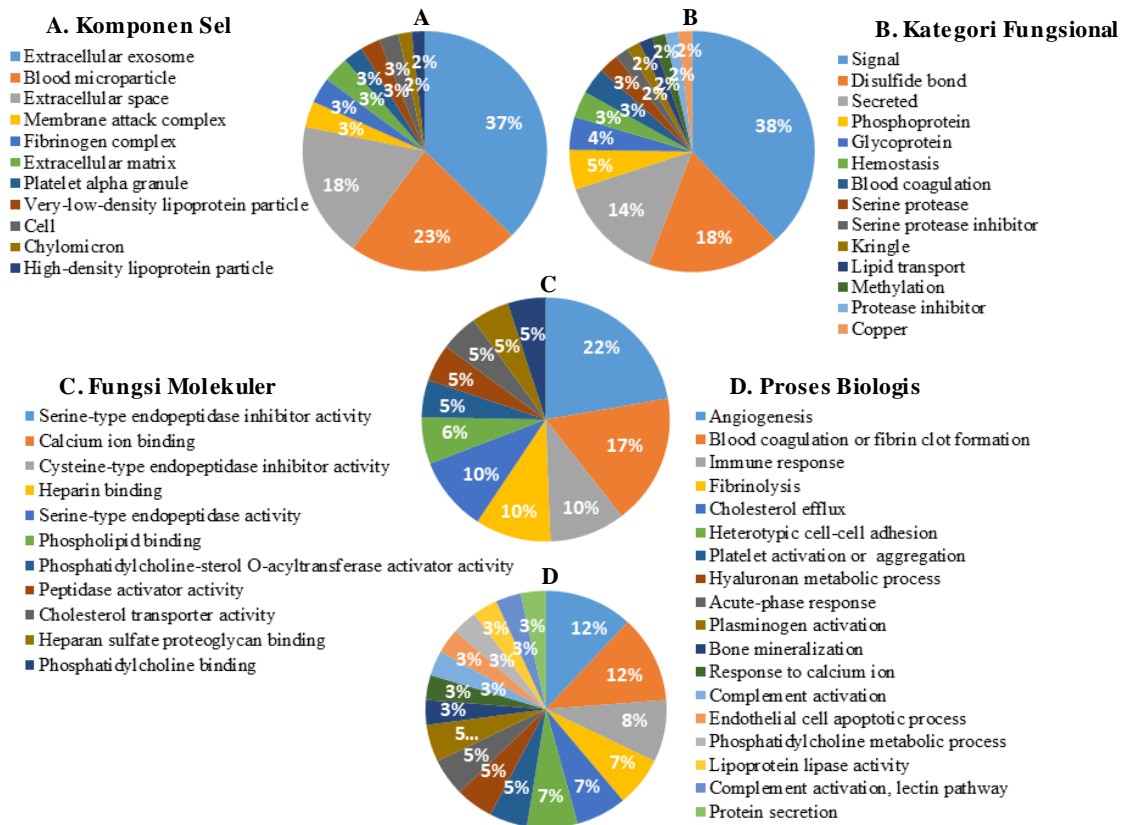
Nama Protein (Gen)	Kode Akses	Peptida Unik	Berat Molekul (kD)	Coverage	Score Seq HT
Alpha 2-HS glycoprotein (AHSG)	W5QH56	8	45,40	25,77	96,74
Alpha-2-macroglobulin(LOC101122940)	W5NSA6	7	164,12	6,36	16,38
Complement C9 (C9)	W5PID9	7	61,90	13,32	18,2
Serpin family A member 1 (SERPINA1)	I1WXR3	6	45,99	15,14	10,24
Angiotensinogen (AGT)	W5NYJ9	6	52,14	19,38	15,62
Haptoglobin (LOC101102413)	W5PoQ4	6	46,22	20,67	14,21
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 1 (ITIH1)	W5NTW3	5	101,59	7,89	24,58
Actin beta (ACTB)	W5NYG7	5	41,97	26,46	19,56
Complement C7 (C7)	W5PH81	5	93,33	7,11	5,29
C-type lectin domain family 3 member B (CLEC3B)	W5PN97	5	22,25	35,12	19,6
Clusterin (LOC101113728)	W5PZ11	5	50,98	15,03	16,02
Serpin family D member 1 (SERPIND1)	W5Q4Q3	5	54,61	12,47	14,4
Histidine rich glycoprotein (HRG)	W5QH50	5	58,70	10,96	13,26
Albumin (ALB)	P14639	4	69,14	59,97	367,36
Fibrinogen beta chain (FGB)	W5NQ45	4	56,91	6	14
Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (AMBIP)	W5P812	4	39,20	15,06	9,09
Serpin family G member 1 (SERPING1)	W5PJZ1	4	57,12	7,49	19,91
Fetuin B (FETUB)	W5QH54	4	42,56	11,89	21,2
Complement C3 (C3)	O46544	3	39,66	30,09	77,49
Retinol binding protein 4 (RBP4)	W5NZ47	3	18,88	16,97	2,87
Complement component 4 binding protein alpha (C4BPA)	W5PBY0	3	68,70	7,99	7,42
Complement C6 (C6)	W5PGT6	3	104,84	5,57	5,2
Fibrinogen gamma chain (FGG)	W5Q5A6	3	49,25	8,29	1,96
Extracellular matrix protein 1 (ECM1)	W5Q129	3	60,39	6,45	3,95
Paraoxonase 1 (PON1)	W5NY46	2	39,87	7,04	1,66
Orosomuroid 1 (ORM1)	W5P7S6	2	23,24	10	25
C-reactive protein (CRP)	W5PD71	2	25,26	8,93	5,71
Complement C8 beta chain (C8B)	W5PE53	2	68,87	4,1	4,87
Leucine rich alpha-2-glycoprotein1 (LRG1)	W5PHP8	2	39,22	6,23	0
Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)	W5PMS1	2	80,31	3,65	1,69
Serpin family A member 5 (SERPINA5)	W5QoL2	2	52,30	4,06	1,67
Vitronectin (VTN)	W5Q9D5	2	53,46	4,63	4,01
Fibulin 1 (FBLN1)	W5QDP8	2	77,07	2,99	0
Adiponectin, C1Q and collagen domain containing (ADIPOQ)	W5QH34	2	30,59	6,71	1,98

albumin dan globulin, terdapat pada cairan SF domba dengan konsentrasi berturut-turut $1,49 \pm 0,38$ dan $0,81 \pm 0,28$ g/dL (Ameri dan Gharib 2005). Albumin memiliki berkelimpahan berat molekul (BM) ± 66 kD dan globulin dengan BM ± 54 kD terkonfirmasi pada hasil SDS-PAGE mengalami penurunan ketebalan pita pada daerah tersebut (Gambar 2). Hal ini menunjukkan deplesi dengan metode penukar ion efektif mendepleksi sebagian besar protein tinggi pada cairan sinovial sendi domba.

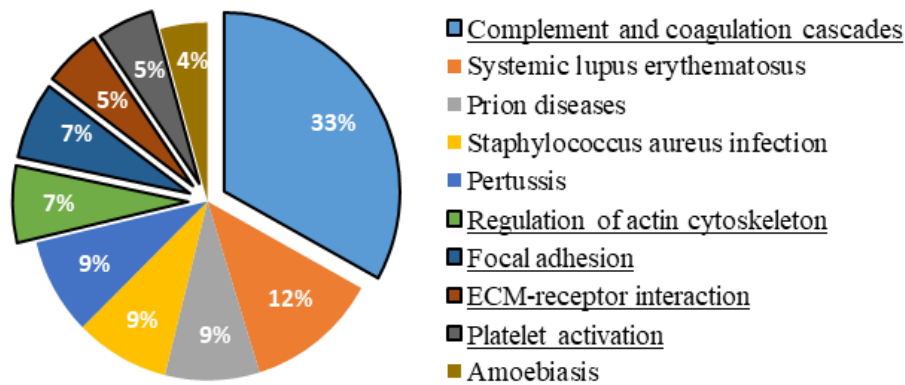
Metode FASP mampu menghilangkan sisa-sisa reagen seperti garam-garaman atau detergen yang akan meningkatkan hasil analisis identifikasi protein oleh spektrometri massa (Potriquet et al., 2017). Metode FASP menggunakan mekanisme ultrafiltrasi dengan membran berpori yang dapat menahan protein, sementara itu detergen dan garam-garaman akan melewati membran sehingga dapat dibuang. Pemurnian peptida dengan FASP memungkinkan

penghilangan bahan-bahan kimia yang mengganggu dalam proses identifikasi peptida (Wiśniewski et al., 2017). Hasil penelitian juga sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa penggunaan FASP dalam digesti protein menghasilkan protein yang teridentifikasi paling banyak jika dibandingkan dengan digesti *in-solution* dan urea *in-gel* (Bennike et al., 2014).

Fraksinasi dengan UPLC menggunakan metode SCX mampu meningkatkan perolehan protein yang teridentifikasi dari 9-46 jenis protein yang teridentifikasi pada Metode 1-2C (tanpa fraksinasi UPLC) menjadi 94 jenis protein pada Metode 3 (dengan fraksinasi UPLC, Tabel 3). Fraksinasi bertujuan mengurangi kompleksitas protein yang akan dianalisis menggunakan metode spektrometri massa tandem maupun kromatografi cair, sehingga akan meningkatkan hasil analisis identifikasi protein. Proses fraksinasi bisa dilakukan pada tingkat protein sebelum proses digesti, bisa juga dilakukan pada



Gambar 4 Protein terkarakterisasi dikelompokkan berdasarkan A. Kategori fungsional, B. Komponen sel, C. Fungsi molekuler, dan D. Proses biologis menggunakan DAVID analysis



Gambar 5 Analisis KEGG pathways terhadap protein terkarakterisasi menggunakan DAVID analysis. Terdapat lima KEGG pathways yang relevan (yang digaris-bawahi) dengan fungsi cairan sinovial pada domba

tingkat peptida setelah digesi. Metode fraksinasi pada tingkat protein contohnya ialah menggunakan gel SDS-PAGE (Jafari et al., 2012), sementara fraksinasi pada tingkat peptida diantaranya ialah reverse-phase (Gan et al., 2005), *isoelectric point* (Michel et al., 2003), dan *strong ion exchange* (SCX) (Choudhary et al., 1996). Penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa fraksinasi lisat sel dan plasma darah menggunakan metode SCX menunjukkan hasil analisis proteomik yang lebih

baik dibandingkan dengan menggunakan metode *isoelectric point* maupun SDS-PAGE (Mostovenko et al., 2013).

Protein-protein yang terkarakterisasi pada SF domba pada penelitian (Tabel 4) sesuai dengan penelitian-penelitian terdahulu pada spesies lain, serta berperan penting pada kondisi normal maupun dalam patogenesis penyakit sendi. Protein serotransferin, hemopexin, apolipoprotein A-I, alpha 2-HS glycoprotein, dan albumin telah dilaporkan

termasuk protein utama pada cairan sinovial babi (Bennike et al., 2014). Protein seperti fibronectin, fibulin, COMP, SERPIN, apolipoprotein, gelsolin, dan clusterin, telah dilaporkan merupakan produk sekretom dari sel-sel kondrosit (Sanchez et al., 2017). Produk-produk sekretom dari sel kondrosit tersebut berperan sebagai protein ECM, inhibitor reaksi enzimatik, serta fungsi biologis lain seperti interaksi proteoglikan-kolagen, sitoskeleton, dan penghambatan agregasi protein dan apoptosis (Sanchez et al., 2017). Apolipoprotein A-I dan A-IV (A4) juga telah dilaporkan pada SF manusia dimana peningkatan ekspresinya berhubungan dengan kejadian OA (Liao et al., 2013). Protein alpha-1-microglobulin/bikuninprecursor, fibrinogen gamma chain, alpha-2-macroglobulin, apolipoprotein H, komplemen C3, ceruloplasmin, haptoglobulin, orosomucoid 1, serta GC, vitamin D binding protein telah dilaporkan oleh peneliti lain mengalami *up-regulation* pada kejadian OA dibandingkan pada kondisi normal (Gobezie et al., 2007).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein-protein yang terdapat dalam SF berperan sebagai protein signal yang bersesuaian dengan jenisnya sebagai eksosom ekstraseluler dan pengisi ruang ekstraseluler (Gambar 4). Cairan SF merupakan filtrat dari plasma darah dan sekreta dari sel-sel pembentuk jaringan sendi, seperti sel-sel sinoviosit, kondrosit, makrofag A, dan *fibroblast-like B cell* (Blewis et al., 2007). Fungsi molekuler menunjukkan bahwa protein-protein SF domba memiliki aktivitas inhibitor enzimatik. Aktivitas inhibitor enzimatik pada penelitian ini terutama melibatkan protein-protein SERPIN *family* (Sanchez et al., 2017). Fungsi biologis protein-protein dalam SF penelitian ini dapat dikelompokkan sebagai koagulasi darah atau pembentukan fibrin. Protein-protein koagulasi darah atau pembentuk fibrin diduga berperan penting dalam perbaikan awal pasca-trauma atau selama stimulasi perbaikan jaringan tulang rawan oleh sumsum tulang (McCarty et al., 2011).

Analisis KEGG *pathways* menunjukkan lima dari sepuluh *pathway* hasil analisis memiliki relevansi dengan fungsi protein cairan sinovial sendi domba, karena lima *pathway* yang lain terkait dengan infeksi atau penyakit infeksius (Gambar 5). Dari kelima *pathway* yang relevan, *pathway* “*complement and coagulation cascade*” merupakan *pathway* yang paling dominan. *Pathway complement and coagulation cascade* telah dilaporkan sebelumnya

terlibat pada patogenesis OA pada manusia (Liao et al., 2018). Reaksi komplemen, terutama berpe-rantara *complement component 5 (C5)* dan C6-C9 membentuk *membrane attack complex (MAC)* yang akan berperan penting pada patogenesis munculnya penyakit OA (Wang et al., 2011). Sementara itu protein clusterin dan vitronectin yang juga teridentifikasi pada penelitian (Tabel 4), memiliki peran dalam menghambat kaskade MAC dalam *pathway complement and coagulation cascade*, serta telah dilaporkan merupakan protein yang terdapat pada SF kondisi normal (Gobezie et al., 2007). Hasil penelitian ini mendukung penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa protein-protein yang terdapat pada cairan sinovial sendi memiliki peran utama pada *pathways complement and coagulation cascades* yang merupakan salah satu *pathway* yang penting, baik pada kondisi normal maupun patologis.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

DAFTAR PUSTAKA

- Ameri M, Gharib Z. 2005. Analysis of synovial fluid from clinically healthy Iranian fat-tailed sheep. *Comparative Clinical Pathology* 13: 186-189.
- Balakrishnan L, Nirujogi RS, Ahmad S, Bhattacharjee M, Manda SS, Renuse S, Kelkar DS, Subbannayya Y, Raju R, Goel R, Thomas JK, Kaur N, Dhillon M, Tankala SG, Jois R, Vasdev V, Ramachandra Y, Sahasrabuddhe NA, Prasad TsK, Mohan S, Gowda H, Shankar S, Pandey A. 2014. Proteomic analysis of human osteoarthritis synovial fluid. *Clinical Proteomics* 11(1): 6.
- Bennike T, Ayturk U, Haslauer CM, Froehlich JW, Proffen BL, Barnaby O, Birkelund S, Murray MM, Warman ML, Stensballe A, Steen H. 2014. A normative study of the synovial fluid proteome from healthy porcine knee joints. *Journal of Proteome Research* 13(10): 4377-4387.
- Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah RL. 2007. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *European Cells & Materials* 13: 26-39.
- Choudhary G, Horváth C. 1996. Ion-exchange chromatography. *Methods in Enzymology* 270: 47-82.

- Cope PJ, Ourradi K, Li Y, Sharif M. Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthritis and Cartilage* 2019. 27(2): 230-239.
- Day AJ, Prestwich GD. 2002. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *The Journal of Biological Chemistry* 277(7): 4585-4588.
- Filip S, Vougas K, Zoidakis J, Latosinska A, Mullen W, Spasovski G, Mischak H, Vlahou A, Jankowski J. 2015. Comparison of depletion strategies for the enrichment of low-abundance proteins in urine. *PLoS One* 10(7): e0133773.
- Fraser JR, Kimpton WG, Pierscionek BK, Cahill RN. 1993. The kinetics of hyaluronan in normal and acutely inflamed synovial joints: observations with experimental arthritis in sheep. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 22(6 Suppl 1): 9-17.
- Gan CS, Reardon KF, Wright PC. 2005. Comparison of protein and peptide prefractionation methods for the shotgun proteomic analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* 5(9): 2468-2478.
- Gobezie R, Kho A, Krastins B, Sarracino DA, Thornhill TS, Chase M, Millett PJ, Lee DM. 2007. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 9(2): R36.
- Jafari M, Primo V, Smejkal GB, Moskovets EV, Kuo WP, Ivanov AR. 2012. Comparison of in-gel protein separation techniques commonly used for fractionation in mass spectrometry-based proteomic profiling. *Electrophoresis* 33(16): 2516-2526.
- Kosinska MK, Ludwig TE, Liebisch G, Zhang R, Siebert HC, Wilhelm J, Kaesser U, Dettmeyer RB, Klein H, Ishaque B, Rickert M, Schmitz G, Schmidt TA, Steinmeyer J. 2015. Articular joint lubricants during osteoarthritis and rheumatoid arthritis display altered levels and molecular species. *PLoS One* 10(5): e0125192.
- Liao W, Li Z, Wang H, Wang J, Fu Y, Bai X. 2013. Proteomic analysis of synovial fluid: insight into the pathogenesis of knee osteoarthritis. *International Orthopaedics* 37(6): 1045-1053.
- Liao W, Li Z, Zhang H, Li J, Wang K, Yang Y. 2015. Proteomic analysis of synovial fluid as an analytical tool to detect candidate biomarkers for knee osteoarthritis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(9): 9975-9989.
- Liao W, Li Z, Li T, Zhang Q, Zhang H, Wang X. 2018. Proteomic analysis of synovial fluid in osteoarthritis using SWATH-mass spectrometry. *Molecular Medicine Reports* 17(2): 2827-2836.
- Mateos J, Lourido L, Fernández-Puente P, Calamia V, Fernández-López C, Oreiro N, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. 2012. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteomics* 75(10): 2869-2878.
- Mazzucco D, Scott R, Spector M. Composition of joint fluid in patients undergoing total knee replacement and revision arthroplasty: correlation with flow properties. *Biomaterials* 2004. 25(18): 4433-4445.
- McCarty WJ, Luan A, Siddiqui M, Hansen BC, Masuda K, Sah RL. 2011. Biomechanical properties of mixtures of blood and synovial fluid. *Journal of Orthopaedic Research* 29(2): 240-206.
- Michel PE, Reymond F, Arnaud IL, Josserand J, Girault HH, Rossier JS. 2003. Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel isoelectric focusing. *Electrophoresis* 24(1-2): 3-11.
- Mostovenko E, Hassan C, Rattke J, Deelder AM, van Veelen PA, Palmblad M. 2013. Comparison of peptide and protein fractionation methods in proteomics. *EuPA Open Proteomics* 1:30-37.
- Music E, Futrega K, Doran MR. 2018. Sheep as a model for evaluating mesenchymal stem/stromal cell (MSC)-based chondral defect repair. *Osteoarthritis and Cartilage* 26(6): 730-740.
- Nazaal AR, Al-Judi AMH, Abdulla FA. 2005. Bacterial, cytological and biochemical study of arthritis in sheep and goats. *Iraqi Journal of Veterinary Medicine* 29(2): 93-100.
- Peffer MJ, Smagul A, Anderson JR. 2019. Proteomic analysis of synovial fluid: current and potential uses to improve clinical outcomes. *Expert Review of Proteomics* 16(4): 287-302.
- Potriquet J, Laohaviroj M, Bethony JM, Mulvenna J. 2017. A modified FASP protocol for high-throughput preparation of protein samples for mass spectrometry. *PLoS One* 12(7): e0175967.
- Rohde C, Anderson DE, Desrochers A, St-Jean G, Hull BL, Rings DM. 2000. Synovial fluid analysis in cattle: a review of 130 cases. *Veterinary Surgery* 29(4): 341-346.
- Sanchez C, Bay-Jensen AC, Pap T, Dvir-Ginzberg M, Quasnichka H, Barrett-Jolley R, Mobasher A, Henrotin Y. 2017. Chondrocyte secretome: a source of novel insights and exploratory biomarkers of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 25(8): 1199-1209.
- Skiöldebrand E, Ekman S, Mattsson Hultén L, Svala E, Björkman K, Lindahl A, Lundqvist A, Önnarfjord P,

- Sihlbom C, Rüetschi U. 2017. Cartilage oligomeric matrix protein neoepitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: A new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine Veterinary Journal* 49(5): 662-667.
- Tan WM, Lau SF, Ajat M, Mansor R, Abd Rani PAM, Rahmad NB. 2017. Proteomic analysis of synovial fluid obtained from a dog diagnosed with idiopathic immune-mediated polyarthritis. *Topics in Companion Animal Medicine* 32(1): 24-27.
- Tu C, Rudnick PA, Martinez MY, Cheek KL, Stein SE, Slebos RJ, Liebler DC. 2010. Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *Journal of Proteome Research* 9(10): 4982-4991.
- Wang Q, Rozelle AL, Lepus CM, Scanzello CR, Song JJ, Larsen DM, Crish JF, Bebek G, Ritter SY, Lindstrom TM, Hwang I, Wong HH, Punzi L, Encarnacion A, Shamloo M, Goodman SB, Wyss-Coray T, Goldring SR, Banda NK, Thurman JM, Gobezie R, Crow MK, Holers VM, Lee DM, Robinson WH. 2011. Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nature Medicine* 17(12): 1674-1679.
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 6(5): 359-362.
- Wiśniewski JR. 2017. Filter-aided sample preparation: the versatile and efficient method for proteomic analysis. *Methods in Enzymology* 585: 15-27.