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

Study the properties of afamin in obese Diabetes Mellitus patients type 2

Zereen Mustafa Sami Abdi

M.Sc. Thesis in
Chemistry Science / Biochemistry

Supervised by

Professor Dr. Zahraa Mohammed Ali Ahmed Hammodat

1445 A.H. **2023 A.D.**

Abstract

Afamin (AFM) is a protein expressed in the liver, essential in type 2 Diabetes Mellitus disease and obesity. The study includes studying the properties of afamin, its purification, and its isolation from the serum of obese type 2 diabetic patients and obese healthy subjects. This study includes two parts:

Part One (Clinical Study): This part included clinical estimation of the level of afamin in the serum of obese patients with type 2 diabetes. This study was conducted from (1st September 2022 to 25th December 2022) at an Azadi teaching hospital in Dohuk Governorate. The study included (150) adults; (75) were patients with T2DM aged between (35-65) years from both sexes (50 females, 25 males), and the rest, (75) as controls, matched with age from both sexes (38 females, 37 males). Patients and controls are divided into two age groups: the first group includes persons aged (35-50) years, and the second group includes those aged (51-65) years. At the same time, patients and controls are divided into three groups according to the indicator of obesity: the first group represents normal weight (BMI 18.5-24.9), the second group represents overweight (BMI 25-29.9), and the third group represents obese people (BMI≥30). This study also included measuring 23 biochemical variables related to this disease.

The level of afamin increased significantly ($p<0.0001$) in T2DM patients compared to the control group. Also, the levels of afamin for both patients and control groups increased significantly ($p<0.0001$) in obese people compared to overweight and normal people. While the level of afamin was not affected by age or six factors.

The results showed that there was a significant increase in the group of patients with type 2 diabetes when compared with the control group for each of leptin, glucose, HbA1c%, insulin, insulin resistance, cholesterol, triglyceride, (HDL), (LDL), (VLDL), (ALT), aspartate aminotransferase (AST), (ALP), creatinine, urea, (MDA), Uric acid, Phosphorous, and BMI. In contrast, adiponectin, (HDL), and (GSH) showed a significant decrease in the patient group

when compared with the control group. The results also showed that there was a significant positive correlation for afamin with each of leptin, glucose, HbA1c%, insulin, insulin resistance, triglyceride, LDL, ALT, AST, ALP, creatinine, urea, MDA, uric acid and BMI in T2DM patient group. On the other hand, afamin showed a significant negative correlation with adiponectin and glutathione. In contrast, an insignificant negative correlation was observed between afamin and cholesterol, HDL, calcium, and phosphorous. There was no correlation between afamin with each VLDL and the calcium/phosphorous ratio.

Part Two (Technique Study): The second part included isolating and purifying afamin from the serum of obese and non-obese T2DM patients. This is done using three consecutive techniques: ammonium sulfate precipitation at (65%) saturation, dialysis, and gel filtration chromatography (Sephadex G-100).

Two protein bands were obtained from gel filtration chromatography; the first peak (A) has afamin. The specific activity of purified afamin from the serum of obese and non-obese T2DM patients increased when using the gel filtration technique, reaching (14.8 U/mg) and (10.5 U/mg) respectively. The number of purification times increased by (20 folds) and (16.2 folds) respectively, with a recovery rate of (55.6%) and (63.8%). The molecular weight of afamin obtained from the gel filtration technique was (74600±1083 Dalton), (76460±1117 Dalton) for obese and non-obese T2DM patients.

The electrophoresis technique (SDS-PAGE) was used to study the purity of the peak (A) that was isolated by the gel filtration technique and estimate its approximate molecular weight, as the results show one single band of afamin and the molecular weight was 75000 Dalton for obese and non-obese T2DM patients and this is close to the molecular weight of afamin that we obtained from the gel filtration technique for obese and non-obese T2DM patients. Also, using Mulisch's test, afamin was revealed to be a glycoprotein.

الملخص

الأفامين (AFM) هو بروتين يتم التعبير عنه في الكبد، وهو ضروري في مرض السكري من النوع 2 والسمنة. تتضمن الدراسة دراسة خواص الآفامين وتنقيته وعزله من مصل مرضى السكري من النوع الثاني البدينين والأصحاء الذين يعانون من السمنة المفرطة. تتضمن هذه الدراسة جزأين:

الجزء الأول (الدراسة السريرية): تضمن هذا الجزء التقدير السريري لمستوى الأفامين في مصل المرضى الذين يعانون من السمنة المفرطة والمصابين بداء السكري من النوع الثاني. أجريت هذه الدراسة في الفترة من (1 سبتمبر 2022 إلى 25 ديسمبر 2022) في مستشفى آزادي التعليمي في محافظة دهوك. شملت الدراسة (150) شخصاً بالغاً؛ (75) مريضاً بمرض T2DM تتراوح أعمارهم بين (35–65) سنة من كلا الجنسين (50 أنثى، 25 ذكر)، والباقي (75) كمجموعة ضابطة، متطابقة مع العمر من كلا الجنسين (38 أنثى، 37 ذكر). تم تقسيم المرضى والضوابط إلى فئتين عمريتين: المجموعة الأولى تضم الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم بين (35–50) سنة، والمجموعة الثانية تضم الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم بين (51–65) سنة. وفي الوقت نفسه، تم تقسيم المرضى والضوابط إلى ثلاث مجموعات حسب مؤشر السمنة: المجموعة الأولى تمثل الوزن الطبيعي (مؤشر كتلة الجسم 18.5–24.9)، والمجموعة الثانية تمثل الوزن الزائد (مؤشر كتلة الجسم 25–29.9)، والمجموعة الثالثة تمثل الوزن الزائد (مؤشر كتلة الجسم 25–29.9). الأشخاص الذين يعانون من السمنة المفرطة (مؤشر كتلة الجسم ≤30). كما تضمنت هذه الدراسة قياس 23 متغيراً بيوكيميائياً مرتبطاً بهذا المرض.

ارتفع مستوى الافامين معنويا ($P<0.0001$) في مرضى T2DM مقارنة بالمجموعة الضابطة. كما أن مستويات الأفامين لكل من المرضى ومجموعات السيطرة زادت بشكل ملحوظ ($P<0.0001$) في الأشخاص الذين يعانون من السمنة المفرطة مقارنة مع الأشخاص ذوي الوزن الزائد والأشخاص الطبيعيين. في حين أن مستوى الأفامين لم يتأثر بالعمر والجنس.

أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في مجموعة مرضى السكري من النوع الثاني بالمقارنة مع مجموعة السيطرة لكل من هرمون اللبتين، الجلوكوز، HbA1c%، الأنسولين، مقاومة الأنسولين، الكولسترول، الدهون الثلاثية، البروتين الدهني عالي الكثافة (HDL)، البروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL)، البروتين الدهني منخفض الكثافة جدًا (VLDL)، ناقلة أمين الألانين (ALT)، ناقلة أمين الأسبارتات (AST)، الفوسفاتيز القلوي (ALP)، الكرياتينين، اليوريا، المالونالديهايد (MDA)، حمض البوليك، الفوسفور، ومؤشر كتلة الجسم. في المقابل، أظهر الأديبونيكتين والبروتين الدهني عالي الكثافة

(HDL) والجلوتاثيون (GSH) انخفاضًا ملحوظًا في مجموعة المرضى مقارنةً بالمجموعة الضابطة. كما أظهرت النتائج وجود علاقة إيجابية معنوية للأفامين مع كل من اللبتين، الجلوكوز، HbA1c%، الأنسولين، مقاومة الأنسولين، الدهون الثلاثية، LDL، ALT، AST، ALP، الكرياتينين، اليوريا، MDA، حمض اليوريك ومؤشر كتلة الجسم في T2DM. مجموعة المريض. من ناحية أخرى، أظهر الأفامين علاقة سلبية معنوية مع الأديبونيكتين والجلوتاثيون. في المقابل، لوحظ وجود علاقة سلبية غير معنوية بين الأفامين والكوليسترول، HDL، والكالسيوم، والفوسفور. لم يكن هناك ارتباط بين الأفامين مع كل VLDL ونسبة الكالسيوم / الفوسفور.

الجزء الثاني (الدراسة التقنية): تضمن الجزء الثاني عزل وتنقية الآفامين من مصل مرضى T2DM البدينين وغير البدينين. وتم ذلك باستخدام ثلاث تقنيات متتالية: ترسيب كبريتات الأمونيوم عند تشبع (65%)، الديلزة، وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (Sephadex G-100).

تم الحصول على شريطين من البروتين من كروماتوجرافيا الترشيح الهلامي؛ الحزمة الأولى (A) لديها الأفامين. ارتفع النشاط النوعي للأفامين المنقى من مصل مرضى T2DM البدناء وغير البدناء عند استخدام تقنية الترشيح الهلامي، حيث وصل إلى (14.8 وحدة / ملغ) و (10.5 وحدة / ملغ) على التوالي. زاد عدد مرات التنقية بمقدار (20 مرة) و (16.2 مرة) على التوالي وبنسبة استرداد (55.6%) و (63.8%). كان الوزن الجزيئي للأفامين الذي تم الحصول عليه من تقنية الترشيح الهلامي (74600±1083 دالتون)، (76460±1117 دالتون) لمرضى T2DM البدينين وغير البدينين.

تم استخدام تقنية الفصل الكهربائي (SDS-PAGE) لدراسة نقاوة الحزمة (A) التي تم عزلها بتقنية الترشيح الهلامي وتقدير وزنها الجزيئي التقريبي، حيث أظهرت النتائج حزمة واحدة من الافامين وكان الوزن الجزيئي (75000 دالتون) لمرضى T2DM البدينين وغير البدينين وهذا قريب من الوزن الجزيئي للأفامين الذي حصلنا عليه من تقنية الترشيح الهلامي لمرضى T2DM البدينين وغير البدينين. أيضًا، باستخدام اختبار موليش، تم الكشف عن أن الأفامين عبارة عن بروتين سكري.

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

دراسة خصائص الأفامين في مرضى السكري من النوع الثاني الذين يعانون من السمنة المفرطة

زيرين مصطفى سامي عبدي

رسالة ماجستير
علوم الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف
الأستاذ الدكتورة زهراء محمد علي أحمد حمودات

1445هـ 2023م