



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

**تأثير الصوم على بعض المتغيرات الكيموحيوية ودراسة
جزيئية لأنزيم الليسيثين كوليسترول أسايل ترانسفيراز
لمرضى السكر**

رغد عامر أحمد الحياي

أطروحة دكتوراه
الكيمياء

بإشراف

الأستاذ المساعد

الأستاذ المساعد

الدكتورة لمى عبدالمنعم بكر

الدكتور محمد عبدالهادي العبيدي

٢٠٢٣ م

١٤٤٤ هـ

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة البحث في فصلين: الفصل الأول تناول تأثير صيام شهر رمضان على مستوى بعض المتغيرات الكيموحيوية والنسبة المئوية للأحماض الدهنية لأشخاص مصابين بداء السكر بنوعيه الأول والثاني، وكذلك التعرف على تأثير عاملي العمر والجنس في مستوى هذه المتغيرات. تضمنت هذه الدراسة (110) عينة لأشخاص مرضى بداء السكر من النوعين الأول والثاني بدون صيام و(60) عينة لأشخاص اصحاء (مجموعة السيطرة) بدون صيام ومتابعة الاشخاص انفسهم بعد صيام رمضان لمدة (20) يوماً من الذكور والاناث وبفئات عمرية مختلفة تتراوح ما بين (37-75) سنة لمرضى داء السكر من النوع الثاني وما بين (20-22) سنة لمرضى داء السكر من النوع الاول. إذ قدرت متغيرات الكربوهيدرات(الكلوكوز، فحص سكر الدم التراكمي) ومؤشر كتلة الجسم ومتغيرات الدهون (الكوليسترول الكلي، الدهون الثلاثية، كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة، كوليسترول البروتين الدهني واطيء الكثافة، ونسبة Total Cholesterol / HDL-C ، ونسبة Triglyceride / HDL-C، ونسبة LDL-C/HDL-C ، البروتين المرافق AI ، البروتين المرافق B₁₀₀ ، وأنزيم الليسيثين كوليسترول أسايل ترانسفيريز)، الفيتامينات ومضادات الاكسدة (فيتامين D₃، فيتامين E، الكلوتاثاينون، المالوندايالديهايد، وانزيم باروكسونيز 2 (ريل استريز)) والعناصر المعدنية (الخاصين، الكوبلت، السيلينيوم، المغنيسيوم، والكالسيوم) والمركبات البروتينية غير النيتروجينية (اليوريا، الكرياتين، حامض اليوريك) باستخدام عدد التحليل الجاهزة (Kits). وأظهرت هذه الدراسة نتائج تحليل وقياس النسبة المئوية للأحماض الدهنية المشبعة والأحماض الدهنية غير المشبعة الاحادية والأحماض الدهنية غير المشبعة المتعددة في المكونات الدهنية لمصل الدم لأجزائه الثلاثة (استر الكوليسترول، والدهون الثلاثية، والدهون الفوسفاتية) باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز الشعري.

الفصل الثاني من الدراسة تضمن تنقية جزئية ودراسة كيموحيوية جزئية لأنزيم الليسيثين كوليسترول أسايل ترانسفيريز من مصل الدم لأشخاص يعانون من داء السكر من النوع الأول، وطبقت تقنيات عدة للتنقية ابتداء من الترسيب بكبريتات الامونيوم ثم الفرز الغشائي فكروماتوغرافيا التبادل الايوني و أخيراً الهجرة الكهربائية. وتم التوصل إلى ان للانزيم متماثل واحدا واعلى فعالية كان مقدارها (328×10⁻³ Unit/ml)، وكما أكدت النتائج على وجود حزمة

منفردة عند تطبيق الهجرة الكهربائية على الانزيم المنقى من التبادل الايوني، وكان بوزن جزيئي تقريبي مقداره (68 kDa). واهتم هذا المحور بتوصيف الانزيم وامكانية تثبيطه بفعل الادوية (الكليمبيريد والاسبرين)، وكانت الدرجة الحرارية المثلى للانزيم ($30^{\circ}C$)، ووجد أن الدرجة الحامضية المثلى للانزيم مقدارها (5.5) عند استخدام محلول البوتاسيوم داي فثاليت كمحلول منظم، وزمن الحضانة الامثل (20min). وتبين من النتائج أنه عند استخدام الكليمبيريد كان التثبيط من النوع التنافسي وبلغت اعلى نسبة تثبيط (63.9%) عند تركيز ($5 \mu g/ml$)، وكذلك عند استخدام الاسبرين فقد كان التثبيط من النوع التنافسي أيضا وإن أعلى نسبة تثبيط بلغت (29.1%) عند تركيز ($5 \mu g/ml$) من هذه المادة. بينت نتائج دراسة الجين المسؤول عن انزيم الليسيثين كوليسترول أسايل ترانسفيريز للاكسون 4 واكسون 6 للمرضى المصابين بداء السكر من النوع الأول إذ تضمنت هذه الدراسة تقنيات عدة بدءا من استخلاص الحامض النووي (DNA) لدم مرضى داء السكر من النوع الأول ومجموعة السيطرة وقيست تراكيز الـ (DNA) ونقاوته باستخدام جهاز (Nano-dropspectrophotometric analysis) إذ أظهرت النتائج أن المعدل الكلي لتركيز DNA لمجموعة السيطرة بلغ ($30.17 \text{ ng}/\mu\text{l}$) اما مجموعة المرضى المصابين بداء السكر من النوع الأول تركيز DNA لهم بلغ ($8.43 \text{ ng}/\mu\text{l}$). كما تم استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل من خلال استخدام جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي للوقت الفعلي إذ ظهرت حزم DNA واضحة. وكذلك أظهرت نتائج التعبير الجيني وجود اختلافات معنوية في التعبير الجيني لأنزيم الليسيثين كوليسترول أسايل ترانسفيريز وللاكسون 4 و6 عند مقارنة مجموعة مرضى داء السكر من النوع الأول مع مجموعة السيطرة وفي حالة الصيام لكلا المجموعتين. اختبرت نتائج المتسلسل qRT-PCR للنموذج رقم 4 لأنزيم الليسيثين كوليسترول أسايل ترانسفيريز والتي تضمنت LCAT(Exon6) و LCAT(Exon4) بواسطة تقنية التسلسل المتعاقب ومقارنة النتائج للفئات المدروسة مع نتائج التسلسل المتعاقب للفئة الطبيعية لكل اكسون وقد تبين من خلال النتائج أن LCAT(Exon6) و LCAT(Exon4) اربعة أنواع من الطفرات المختلفة إذ تمثل الطفرات الاربعة جميعها من نوع (point mutation) وهي طفرات تحولية (Transversion) وانتقالية (Transition) وحذف (Deletion) وادخال (Insertions) وبمواقع مختلفة على الاكسونين، قد يكون لإحدى هذه الطفرات اثر في فعالية الانزيم نتيجة تغير الحوامض الامينية في الموقع الفعال للانزيم بالتالي تنخفض فعاليته.

Summary

The study is included into in two chapters, the first chapter deals with the effect of Ramadan fasting on biochemical variables and the percentage of fatty acids in persons with type 1 and type 2 diabetes, as well as the effect of age and gender on the level of these variables. This study included (110) samples of patients with type 1 and type 2 diabetes who did not fast and (60) samples of healthy people (control group) who did not fast, as well as a follow-up on the same people after fasting (20) days of Ramadan, male and female, with ages between from 20 to 75 years old. Carbohydrate variables (glucose, glycosylated hemoglobin), body mass index, lipid variables (Total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, very low-density lipoprotein cholesterol, phospholipids, Total Cholesterol/HDL-C, Triglyceride/HDL-C, LDL-C, Apo AI, ApoB100, lecithin cholesterol acyltransferase enzyme), vitamins, antioxidants (vitamin D₃, vitamin E, glutathione, malondialdehyde, paraoxonase 2 (aryl esterase), mineral zinc, cobalt, selenium, magnesium, calcium) and renal function (urea, creatinine, uric acid) using ready-made analysis number (Kits). The current study showed the results of analyzing and measuring the percentage of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids in the fatty components of the blood serum for its three parts (cholesterol ester, triglycerides, and phospholipids) using a Chromatograph Gas Capillary.

The second chapter of the study dealt with purifying and studying a partial of a molecular biochemical study of the enzyme lecithin cholesterol acyltransferase from the blood serum of people with type 1 diabetes. Several purification techniques were applied, starting with precipitation with ammonium sulfate, then dialysis, ion exchange

chromotography, and finally electrophoresis. It was concluded that the enzyme was identical and the highest activity was (328×10^{-3}) unit/ml, and as the results showed on the presence of a single band when applying electrophoresis on the purified enzyme from ion exchange, it had an approximate molecular weight of (68) kDa . This axis was concerned with the description of the enzyme and the possibility of its inhibition by drugs (Glimepiride and aspirin), and the optimum temperature of the enzyme was (30°C), and it was found that the enzyme had an pH (5.5) when using potassium diphthalate solution as a buffer solution, and the optimum incubation time was (20) minutes . The results showed that when using Glimepiride, the inhibition was of the competitive type, and the highest percentage of inhibition was (63.9%) at a concentration of (5) $\mu\text{g/ml}$, while when using aspirin, the inhibition was of the competitive type as well, and the highest percentage of inhibition was (29.1%) when Concentration (5) $\mu\text{g/ml}$ of this substance. This is was showed by the results of studying the gene which is responsible for the lecithin-cholesterol acyltransferase enzyme for exon 4 and exon 6 for patients with type 1 diabetes. The current study includes several techniques, starting with DNA extraction from the blood of patients with type 1 diabetes and the control group. The DNA concentrations and its purity were measured using a (Nano-drop spectrophotometric analysis), where the results showed that the total average of the DNA concentration for the control group was (30.17) $\text{ng}/\mu\text{l}$, while the group of patients with type 1 diabetes had a DNA concentration of (8.43) $\text{ng}/\mu\text{l}$. The polymerase chain reaction technology was also used, through the use of a quantitative real-time polymerase chain reaction, where clear DNA bands were cleared. Also, the results showed significant differences in the gene expression of the enzyme lecithin cholesterol acyltransferase and exon 4 and 6 when comparing the group of type 1 diabetes patients with the control group

and in the fasting condition for both groups. The qRT-PCR results were tested for model No. 4 for the enzyme lecithin cholesterol acyl transferase, which included LCAT(Exon4) and LCAT(Exon6) by sequencing technique and comparing the results of the studied groups with the sequencing results of the natural category for each exon. Through the results LCAT (Exon4) and LCAT (Exon6) showed that four types of the different mutations represent all mutations of type (Point mutation), which are (Transversion), (Transition), (Deletion) and (Insertions) at different sites on the exons. One of these mutations may have an effect on the enzyme's activity as a result of changing the amino acids in the active site of the enzyme, thus decreasing its effectiveness.

**University of Mosul
College of Education
For Pure Science**



**Fasting Effect on some biochemical parameters and
molecular study of lecithin cholesterol
acyltransferase for Diabetics**

Raghad Amer Ahmed Al-Hayali

**Ph.D. Thesis
Chemistry**

Supervised By

**Assist. Prof.
Dr. Mohammed Abd AL-hadi Al-obaidy**

**Assist. Prof.
Dr. Luma Abd Almunim baker**

A.D 2023

A.H 1444