جامعة الموصل
كلية العلوم

عزل وتنقية الأوستيوكالسين ودراسة علاقته ببعض المتغيرات الكيموحيوية لداء السكر

لقاء سعيد عبد الله عمر

اطروحة دكتوراه

علوم الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذة الدكتورة ذكرى علي علوش

3419هـ 2018 م

جامعة الموصل
كلية العلوم

عزل وتنقية الأوستيوكالسين ودراسة علاقته ببعض المتغيرات الكيموحيوية لداء السكر

اطروحة تقدمت بهـــا

لقاء سعيد عبد الله عمر

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة
في الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذة الدكتورة ذكرى علي علوش

3419هـ 2018 م

شكر وعرفان

لا اله إلا الله الذي له الآلاء والنعماء، سجدت له الجباه وسبح له ما في الارض والسماء، فالحمد لله ثم الحمد لله ما توفيقي ولا اعتصامي ولا ثقتي إلا بالله عليه توكلت وهو رب العرش العظيم، وصلى الله وسلم على علم الهدى خير خلق الله أجمعين صفوة أنبيائه المصطفى المختار سيدنا محمد عليه أفضل الصلاة وأتم التسليم.

يسعدني وقد أنهيت اطروحتي بفضل الله تعالى ومنه وكرمه، وعرفاناً بالجميل والإمتنان أن أتقدم بخالص شكري وتقديري الى أستاذتي الفاضلة الدكتورة **ذكرى علي علوش** التي كانت بحق نعم الأستاذة والموجهة والمرشدة، ولما أبدته من مساعدة ومساندة منذ بداية الأشراف ولحين الانتهاء من كتابة هذه الأُطروحة على الرغم من العقبات التي واجهتنا في مرحلة العمل، فجزاها الله عني وعن أهلي كل خير وأساله تعالى أن يبلغها ما تأمل.

وأشكر عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم الكيمياء والتدريسين في القسم على تشجيعهم ودعمهم المستمرين لي، وأقدم جزيل الشكر إلى السيد إدريس خليل والدكتور محمود فخري والدكتورة جهان عبد الوهاب لما أبدوا لي من مساعدة.

كما اتوجه بالشكر والتقدير الى منتسبي مركز الوفاء التخصصي لأمراض السكري والغدد الصم، ومنتسبي مركز نقل الدم في الموصل لما أبدوه معي من تعاون خلال جمع عينات نماذج الدم، ويطيب لي أن أشكر كل من الست خولة عدنان لمساعدتي في استعمال جهاز الإليزا في مختبر المناعة في مستشفى السلام في الموصل، وأساتذة كلية التربية/قسم الكيمياء لإتاحتهم لي الفرصة في استعمال جهاز مطياف الانبعاث باللهب، وأساتذة قسم علوم الحياة لمساعدتهم لي في استعمال جهاز مطياف الامتصاص الذري، وأساتذة كلية الزراعة والغابات/قسم الثروة الحيوانية لمساعدتي في استعمال جهاز الهجرة الكهربائية، والدكتور فواز خليل لمساعدتي في استعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء الطور العكسي في الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في نينوى، وأساتذة كلية الطب البيطري/بيت الحيوان وخصوصاً الاستاذ ناظم أحمد والاستاذ أحمد السيدية لمساعدتي لاستعمال حيوانات التجارب، كما أقدم شكري إلى الأستاذ خيري بدل في كلية علوم الحاسبات والرياضيات/قسم الاحصاء والمعلوماتية والدكتور هلال علي في كلية الآداب/قسم اللغة العربية لتقويمه الأُطروحة لغوياً.

والى من لا يوفى شكرهما الكلام ولا كتابة الأقلام **(أمي) و(روح والدي الطاهرة)** أتقدم لهما بالشكر والتقدير والاحترام، وأسال الله تعالى أن يجعلهما ممن حسن عملهما وأساله تعالى أن يوفقني لبرهما، وإيماناً مني بالوفاء أشكر (إخوتي) داعيةً الله تعالى أن يجعلهم من الفائزين في الدارين إنه سميعٌ مجيبٌ.

لقاء

الملخص

تضمن البحث دراسة كيموحيوية للأوستيوكالسين، إذ قسمت الدراسة إلى ثلاثة أقسام:

القسم الأول: تضمن دراسة تقدير تركيز الأوستيوكالسين في مصل دم أشخاص أصحاء ظاهرياً والمرضى المصابين بداء السكر من النوع الأول 1 والنوع الثاني 2، وبيّنت النتائج أن المعدل الطبيعي لتركيز الأوستيوكالسين كان (4.79 ± 28.07 نانوغرام/مل) في مصل دم مجموعة السيطرة وللجنسين كليهما، وبفئات عمرية تتراوح مابين (≥ 15- ≤ 65) سنة، كما أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في تركيز الأوستيوكالسين في مصل دم مرضى داء السكر في النوع الأول 1 والنوع الثاني 2 مقارنة مع مجموعة السيطرة وبين مرضى داء السكر من النوع الأول 1 مقارنة مع النوع الثاني 2، ويتأثر بالعمر والجنس في كل من مجموعة السيطرة ومرضى داء السكر، كما لوحظ تأثير دليل كتلة الجسم، وسن اليأس للإناث، والتدخين، وفصول السنة في كل من مجموعة السيطرة ومرضى داء السكر بنوعيه 1 و 2، كما وجد تأثير لتركيز الكلوكوز والأنسولين، ومدة المرض، والأمراض الأُخرى في مرضى داء السكر بنوعيه 1 و 2.

تم تقدير بعض المتغيرات الكيموحيوية (22) متغيراً في كل من الأصحاء ومرضى داء السكر، وأظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي في تركيز كل من الكلوكوز، ومعامل قياس مقاومة الأنسولين، والأديبونكتين، والمالوندای ألديهايد، والدهون الكلية، والكولستيرول الكلي، والكليسيريدات الثلاثية، والبروتين الدهني الواطىء الكثافة جداً للكولستيرول، والبروتين الدهني الواطىء الكثافة للكولستيرول، ومعامل مسبب التعصدية، والبوتاسيوم، وفي فعالية التريهاليز، وانخفاض معنوي في تركيز كل من الأنسولين، ومعامل قياس وظيفة خلية بيتا، والثايوريدوكسين، والكلوتاثايون، والبروتين الدهني العالي الكثافة للكولستيرول، ومعامل مضاد مسبب التعصدية، والصوديوم، والكالسيوم، والمغنيسيوم، والخارصين في مصل دم مرضى داء السكر من النوع الأول 1 والنوع الثاني 2 مقارنة مع مجموعة السيطرة.

كما درست العلاقة بين الأوستيوكالسين وبعض المتغيرات الكيموحيوية للأصحاء ومرضى السكر بإيجاد معامل الارتباط الخطي، وقد تبيّن ارتباط تركيز الأوستيوكالسين بعلاقة عكسية معنوية مع تركيز كل من الكلوكوز، ومعامل قياس مقاومة الأنسولين، والمالوندای ألديهايد، والدهون الكلية، والكولستيرول الكلي، والكليسيريدات الثلاثية، والبروتين الدهني الواطىء الكثافة جداً للكولستيرول، والبروتين الدهني الواطئ الكثافة للكولستيرول، ومعامل مسبب التعصدية، والبوتاسيوم، وفي فعالية التريهاليز، وبعلاقة طردية معنوية مع تركيز كل من الأنسولين، ومعامل قياس وظيفة خلية بيتا، والأديبونكتين، والثايوريدوكسين، والكلوتاثايون، والبروتين الدهني العالي الكثافة للكولستيرول، ومعامل مضاد مسبب التعصدية، والصوديوم، والكالسيوم، والمغنيسيوم، والخارصين في كل من مجموعة السيطرة ومرضى داء السكر بنوعيه 1 و 2.

القسم الثاني: تضمن محاولة عزل وتنقية الأوستيوكالسين من بلازما دم شخص سليم ظاهرياً ومصل دم جرذان سليمة باستعمال التقنيات الحياتية المختلفة، التي تضمنت الترسيب بالأسيتون البارد وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي، وقد وجد تركيز للأوستيوكالسين في الحزمة الثانية (الحزمة B) من بلازما دم الإنسان ومصل دم الجرذان، وتبيّن أن عدد مرات تنقية الأوستيوكالسين (الحزمة B) من بلازما دم الإنسان (56.61) أعلى من عدد مرات تنقية الأوستيوكالسين (الحزمة B) من مصل دم الجرذان (45.00).

فضلاً عن ذلك, تم الكشف عن نقاوة الهرمون المعزول (الحزمة B) من بلازما دم الإنسان ومصل دم الجرذان باستعمال تقنية الهجرة الكهربائية وكروموتوغرافيا السائل عالي الأداء الطور العكسي، وتبيّن ظهور حزمة منفردة واحدة باستعمال الهجرة الكهربائية للأوستيوكالسين (الحزمة B) المعزولة من بلازما دم الإنسان ومصل دم الجرذان، وأن هناك تطابق في وقت الاحتباس باستعمال كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء للأوستيوكالسين القياسي والأوستيوكالسين (الحزمة B) المعزولة من بلازما دم الإنسان ومصل دم الجرذان، كما تم ايجاد الوزن الجزيئي التقريبي للأوستيوكالسين المعزول والمُنقَّى من بلازما دم الانسان ومصل دم الجرذان، وقد كان (400 ± 6011.73 دالتون) و (400 ± 5248.07 دالتون) على التوالي باستعمال كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي و(5807.64 دالتون) و(4786.30 دالتون) على التوالي باستعمال الهجرة الكهربائية.

القسم الثالث: تم دراسة تأثير الأوستيوكالسين المعزول (الحزمة B) على تنظيم توازن الكلوكوز في ذكور الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالألوكسان، وقد أوضحت النتائج أن هنالك دور للأوستيوكالسين في تنظيم الأيض عن طريق دوره في تحسين تحمل الكلوكوز وتحسين حساسية الأنسولين، فضلاً عن ذلك، تم دراسة تأثير الأوستيوكالسين المعزول من بلازما دم الإنسان ومصل دم الجرذان على بعض المتغيرات الكيموحيوية في الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالألوكسان، وأظهرت النتائج بعد أسبوع من المعاملة بالأوستيوكالسين المعزول من بلازما دم الإنسان ومصل دم الجرذان وبجرعة (1 نانوغرام/كغم من وزن الجسم/يوم) مما يسبب انخفاضاً معنوياً في تركيز كل من الكلوكوز, والمالوندای ألديهايد، والدهون الكلية، والكولستيرول الكلي، والكليسيريدات الثلاثية, والبروتين الدهني الواطىء الكثافة جداً للكولستيرول، والبروتين الدهني الواطىء الكثافة للكولستيرول، ومعامل مسبب التعصدية، وفي فعالية التريهاليز، وارتفاعاً معنوياً في تركيز كل من الثايوريدوكسين، والكلوتاثايون، والبروتين الدهني العالي الكثافة للكولستيرول، ومعامل مضاد مسبب التعصدية في الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان.

University of Mosul
College of Science

Isolation, Purification of Osteocalcin and Study its Relation with Some Biochemical Parameters for Diabetes Mellitus

A thesis submitted

by

Liqa'a Saeed Abdulla Omar

To

Council of the College of Science / University of Mosul In Partial Fulfillment of the Requirements for Degree of Doctor of Philosophy in Chemistry /Biochemistry

Supervised by

Prof. Dr.Thikra Ali Allwsh

2018 A.D 1439 A.H

University of Mosul
College of Science

Isolation, Purification of Osteocalcin and Study its Relation with Some Biochemical Parameters for Diabetes Mellitus

Liqa'a Saeed Abdulla Omar

Ph. Degree
Biochemistry

Supervised by

Prof. Dr.Thikra Ali Allwsh

2018 A.D 1439 A.H

SUMMARY

The research included a biochemical study of osteocalcin which was divided into three parts:

The first part included an estimation of osteocalcin concentration in the serum of apparently healthy individuals and diabetic patients (Type 1 and type 2). The results demonstrated that the normal mean of osteocalcin was (28.07 ± 4.79 ng/mL) in serum of control group for both sexes; their ages range between (≤ 15-≥ 65) year. Also, the results demonstrated a significant decrease in the concentration of osteocalcin in serum of type 1 and type 2 diabetic patients compared with control and between type 1 diabetic patients compared with type 2. Osteocalcin concentration was affected by age and sex for both control and diabetic patients. Furthermore the results showed effect of body mass index, menopausal of females, smoking, and year's seasons in control and diabetic patients (Types 1 and 2), the results also found effect of concentration of glucose and insulin, the disease's duration, and other diseases in diabetic patients (Types I and 2).

Measurement of (22) biochemical parameters in control and diabetic patients were performed. The results showed a significant increase in the concentration of glucose, HOMA-IR, adiponectin, MDA, total lipids, total cholesterol, triglycerides, VLDL-C, LDL-C, atherogenic index, potassium and in trehalase activity, and a significant decrease in the concentration of insulin, HOMA-β, thioredoxin, GSH, HDL-C, antiatherogenic index, sodium, calcium, magnesium, and zinc in serum of diabetic patients (Type 1 and type 2) compared with control group.

Correlation was performed between osteocalcin and some biochemical parameters of healthy individuals and diabetic patients by linear correlation coefficient. The results showed that osteocalcin concentration correlates by a significant negative correlation with concentration of glucose, HOMA-IR, MDA, total lipids, total cholesterol, triglycerides, VLDL, LDL-C, atherogenic index, potassium and in trehalase activity and by a significant positive correlation with concentration of insulin, HOMA-β, adiponectn, thioredoxin, GSH, HDL, antiatherogenic index, sodium, calcium, magnesium and zinc in control and diabetic patients (Types 1 and 2).

The second part concerned with an attempt to isolate and purify osteocalcin from plasma of healthy human and serum of healthy rats using different biochemical techniques. This included precipitation by cold acetone and gel filtration chromatography. It was found that only the second peak (peak B) from human plasma and rats serum had concentration of osteocalcin, and showed that fold of purification of isolated osteocalcin (peak B) from human plasma was (56.61) higher than isolated osteocalcin (peak B) from rats serum (45.00).

Furthermore, the purity of isolated hormone (peak B) from human plasma and rats serum had been identified by electrophoresis and reversed phase high performance liquid chromatography techniques. The obtained results from electrophoresis showed that one single band for isolated osteocalcin (peak B) from human plasma and rats serum, and from high performance liquid chromatography showed that there was a good identical in retention time between the standard and isolated osteocalcin (peak B) from human plasma and rats serum. The comparative molecular weight of partially isolated and purified osteocalcin from human plasma and rats serum was (6011.73 ± 400Dalton) and (5248.07 ± 400 Dalton), respectively using gel filtration chromatography, and (5807.64 Dalton) and (4786.30 Dalton), respectively using electrophoresis technique.

The third part included the effect of isolated osteocalcin on glucose homeostasis in normal and alloxan induced diabetic males rats had been studied and supported a role for osteocalcin in regulating metabolism through its action in glucose tolerance and insulin sensitivity improving. Moreover, the effect of isolated osteocalcin from human plasma and rats serum on some biochemical parameters in normal and alloxan induced diabetic males rats had been studied. The results showed after one week of treatment by the isolated osteocalcin from human plasma and rats serum at the dose (1ng/Kg of body weight/d) caused a significant decrease in the concentration of glucose, MDA, total lipids, total cholesterol, triglycerides, VLDL-C, LDL-C, atherogenic index and in trehalase activity and a significant increase in the concentration of thioredoxin, GSH, HDL-C, and antiatherogenic index in normal and alloxan induced diabetic rats.