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

Evaluation and purification of apelin and its relationship with some biochemical parameters in acute kidney injury in Ninevah Governorate

Anwar Sabah Majid Nasrallah Al-Attar

Ph.D. Thesis

Chemistry / Biochemistry

Supervised by

Asst. Prof. Dr. Layla Abdullah Mustafa

1445 A.H **2024 A.D**

Summary

The purpose of this study is to know the effect of the apelin hormone on the pathology of kidney patients, especially acute kidney injury, and to study its preventive and therapeutic role in acute kidney injury, in this study, 232 blood samples were collected from males and females, 108 of them were from apparently healthy people and 124 of them were from patients with acute kidney failure. The ages ranged between (21-56) years in the time period from May 2022 to February 2023 after they were diagnosed by specialized doctors. In each of the (Al-Salam_Ibn Sina_Al-Jumhuri) educational hospitals and the Central Blood Bank in Mosul, the number of variables that were measured was (25) biochemical variables, where the study was divided into three main parts as follows: -

First part The results shown in the clinical study submitted a significant decrease in level of apelin in patients with acute kidney injury especially in males. While its level decreased with age in both acute kidney injury patients and the control group. It was found apelin increases with increasing body mass in patients with acute kidney injury and in control group, evidence of the direct relationship between level of apelin and body mass index. It decreases in smokers more than nonsmokers, in contrest to what was found in the control groups in addition to that it was found that the level of apelin decreases with the progression of the disease duration and with the presence of other chronic diseases. It was also observed that there was a significant increase in the level of cystatin C, copeptin, FGF23, β2-MG, CK-MB iso enzyme, hs-TNT, urea, creatinine, phosphorus, and potassium (K^+), while a significant increase was observed in the level of trace minerals, which included (Fe, Pb, Cd, Cu), while a significant decrease was observed in the level of (Zn) in patients with acute kidney injury compared to control group, and a significant decrease was observed in level of vitamins, which it included both vitamin D, vitamin E, as well as a significant decrease in level of total antioxidant status (TAS).

Erythropoietin (EPO), microalbumin (Alb), eGFR, TCa, Na^+, Cl^- in serum of patients with acute kidney injury compared to the control group.

Second part included an attempt to isolate and partially purification of apelin from plasma of a control group and serum of healthy rats using different Biotechniques. These techniques included the gel filtration chromatography using (Sephadex G-25) gel, and the approximate molecular weight of apelin (Protein band A) was found in each of the human plasma (6234.47D); it was higher than the approximate molecular weight of apelin (Protein band A) isolated from rats serum, it was exactly (5834.45D), the number of times of purification of apelin (protein band A) (24.3), from human plasma, number of times purified apelin (protein band A) isolated and purified from rats serum (22.3). In addition, the purity of apelin isolated and purified by gel filtration technique (protein band A) from human plasma and rats serum were detected by using Electrophoresis and reverse phase high performance liquid chromatography - (RP-HPLC), as it indicated the presence of one single band using the electrophoresis of apelin (protein band A) isolated from human plasma and rats serum, while a match was found in the retention time using reverse phase high-performance liqued chromatography technique between standard apelin and apelin (Protein band A) isolated from human plasma and rats serum, the obtained approximate molecular weight of apelin (protein band A) isolated and purified from human plasma and rats serum by electrophoresis was (5508.08D) (5223.96D) respectively.

Third part of the study to demonstrate the therapeutic effect of apelin includes two parts namely:-

First part This studay included 32 adult albino male rats, as animals used in the experiment were weight ($188.69 \pm 1.49g$), while their ages ranged from ($13 \pm 1\ week$) which were deivided into for groups that included: (the negative control group (normal) the positive control group (infected), the group treated with ethylene glycol (1.0%/Kg)+(50 μg/kg/day) apelien (protein pand A), the

group treated with ethylene glycol (1.0%/Kg)+(100 μg/kg/day) apelien (protein pand A), it was found that the effect of apelin (protein band A) isolated and partially purified from human plasma and injected internally to be studied on the level of a some of biochemical variables in the serum of apparently healthy male rats and infected with acute kidney injury induced by ethylene glycol at a concentration of (1.0%/kg) of body weight, which were represented by urea, creatinine, total antioxidant status, apelin, and we also studied the effect of apelin (protein band A) injected internally on body weight in the serum of healthy and infected male rats with acute kidney injury, the effect of apelin (protein group A) isolated in healthy and infected male rats with acute kidney injury was studied at two doses (50μg/kg/day), (100μg/kg/day).

The results showed after the fifth week of treatment with apelin isolated and partially purified from human plasma and at a dose of (50 μg/kg/day), there was a significant decrease in the level of both urea and creatinine, while we noticed a significant increase in the level of both total antioxidant status apelin, and in body weight, we also noticed a significant decrease in level of both urea and creatinine increased by higher percentage an after the fifth week of treatment with apelin, isolated and molecularly purified from human plasma at a dose of (100 μg/kg/day), with a significant increase in the level of total antioxidants status and apelin, as well as body weight, in both healthy and infected male rats with acute kidney injury.

Second part it is part in which histological changes of the kidney were studay in experimental animals (white rats male). I noticed the return of the renal tissue changes to the normal or close to normal state by using the dose of (100 µg/kg/day) of apelin (protein band A) at a rate higher than the dose (50 µg/kg/day), and here we are assured of the preventive and curative role that apelin plays and that the higher its level, the more effective it is in treatment higher.

الخلاصة:

إن الغاية من هذه الدراسة هو معرفة تأثير هرمون الابلين على مرضى الكلى وخاصة إصابة الكلى الحادة ودراسة دوره الوقائي والعلاجي على مرضى إصابة الكلى الحادة, حيث تم في هذه الدراسة جمع ٢٣٢ عينة من الذكور والاناث, ١٠٨ منهم كانت لاشخاص اصحاء ظاهرياً, ١٢٤ منهم كانت لمرضى مصابين بالفشل الكليوي الحاد في الدم, تراوحت الاعمار بين (٢١-٥٦) سنة في المدة الزمنية من آيار ٢٠٢٢- شباط ٢٠٢٣, بعد تشخيصهم من قبل اطباء متخصصين في كل من مستشفيات (السلام العام- ابن سينا-الجمهوري) التعليمي ومصرف الدم المركزي في الموصل وكان عدد المتغيرات التي تم قياسها (٢٥) متغير كيمو حيوي, حيث تم تقسيم الدراسة إلى ثلاثة اقسام رئيسية:

القسم الاول أظهرت النتائج الموضحة من الدراسة وجود انخفاض معنوي في مستوى الابلين لدى مرضى إصابة الكلى الحادة وخاصة في الذكور، قل مستواه مع تقدم العمر في كل من مرضى إصابة الكلى الحادة ومجموعة السيطرة وهذا يدل على تأثر مستوى الابلين بالعمر والجنس، بينما وجد انه مستواه يزداد مع زيادة كتلة الجسم في مرضى إصابة الكلى الحادة وكذلك في مجموعة السيطرة وهذا يعطي دليل على العلاقة الطردية بين مستوى الابلين وكتلة الجسم، كما وجد ان مستواه يقل في المرضى المدخنين اكثر من غير المدخنين من المرضى على العكس مما وجد في حالة مجموعة السيطرة، كذلك فإن مستوى الابلين يقل مع تقدم مدة المرض ومع وجود امراض مزمنة اخرى.

كما لوحظ إرتفاع معنوي في مستوى كل من (Cystatin C, Copeptin, FGF23, β2-MG, CK-MB isoenzyme, hs-TNT, Urea, Creatinine, p) كذلك لوحظ وجود ارتفاع معنوي في مستوى المعادن النزرة التي شملت (Cd, pd, Fe, Cu) في حين لوحظ وجود انخفاض معنوي في مستوى معدن الزنك (Zn) لدى مرضى إصابة الكلى الحادة مقارنة بمجموعة السيطرة، في حين لوحظ وجود انخفاض معنوي في مستوى كل من فيتامين E، وفيتامين D، وكذلك في مستوى مضادات الاكسدة الكلى (TAS) في مصل لمرضى إصابة الكلى الحادة، كذلك لوحظ وجود انخفاض معنوي في مستوى كل من(eGFR ,Micro Albumin, Erythropoitin) وكذلك الكالسيوم الكلي (TCa) وكل من ايون الصوديوم (Na^+) وايون الكلورايد (Cl^-) في مصل مرضى إصابة الكلى الحادة مقارنة بمجموعة السيطرة.

القسم الثاني تضمن هذا القسم محاولة عزل وتنقية جزيئية للأبيلين من بلازما انسإن سليم ظاهرياً ومصل جرذان سليمة ظاهرياً باستعمال التقنيات الحياتية المختلفة، حيث تضمنت هذه التقنيات تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام مادة الهلام (Sephadex G-25)، وقد تم إيجاد الوزن الجزيئي التقريبي للأبيلين (الحزمة البروتينية A) في كل من بلازما الإنسان وكانت (6234.47 دالتون) والتي كانت اعلى من الوزن الجزيئي التقريبي للأبيلين (الحزمة البروتينية A) المعزولة من مصل الجرذان والتي

كانت (5834.45 دالتون)، وقد وجد إن عدد مرات تنقية الابلين (الحزمة البروتينية A) من بلازما الإنسان (24.3), عدد مرات تقنية الابلين (الحزمة البروتينية A) المعزولة والمنقاة من مصل الجرذان (22.3)، اضافة إلى ذلك فقد تم الكشف عن نقاوة الابلين المعزول والمنقى بتقنية الترشيح الهلامي (الحزمة البروتينية A) من بلازما الإنسان ومصل الجرذان باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية وكروماتوغرافيا السائل عالي الاداء– الطور العكسي، حيث اشارت إلى وجود حزمة منفردة واحدة باستخدام الهجرة الكهربائية للأبيلين (الحزمة الكهربائية A) المعزولة من بلازما الإنسان ومصل الجرذان، وفي حين تبين وجود تطابق في زمن الأحتباس بإستعمال كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء الابلين القياسي والابلين (الحزمة البروتينية A) المعزولة من بلازما الإنسان ومصل الجرذان، وقد كان الوزن الجزيئي التقريبي الذي تم الحصول عليه للابيلين (الحزمة البروتينية A) المعزولة والمنقاة من بلازما الإنسان بتقنية الهجرة الكهربائية (5508.08 دالتون) في حين كان الوزن الجزيئي التقريبي للابيلين (الحزمة البروتينية A) المعزولة في مصل الجرذان (5223.96 دالتون) وهو مقارب للوزن الجزيئي التقريبي الذي تم الحصول عليه في تقنية الترشيح الهلامي المذكور اعلاه.

القسم الثالث شمل القسم الثالث في هذه الدراسة قسمين هما:

القسم الاول شملت الدراسة ٣٢ جرذاً ذكراً ابيضاً بالغاً, حيث كان وزن الحيوانات المستخدمة في الدراسة (١٨٨.٦٩±١.٤٩) غرام بينما تراوحت أعمارها (١±١٣) اسبوع قسمت الى أربعة مجاميع والتي تضمنت مجموعة السيطرة السالبة (الطبيعية), مجموعة السيطرة الموجبة (المصابة), مجموعة معاملة بالأثيلين كلايكول (١.٠%/كيلوغرام)+ (٥٠ مايكروغرام/كيلوغرام/يوم) من الابلين (الحزمة البروتينية A), مجموعة معاملة بالأثيلين كلايكول (١.٠%/كيلوغرام)+ (١٠٠ مايكروغرام/كيلوغرام/يوم) من الابلين (الحزمة البروتينية A), وقد وجد ان تأثير الابلين (الحزمة البروتينية A) المعزول والمنقى من بلازما الإنسان والمحقون باطنياً على مستوى عدد من المتغيرات الكيموحيوية في ذكور الجرذان السليمة ظاهرياً والمصابة بإصابة الكلى الحادة المستحدث بمادة الاثيلين كلايكول (1.0%/ كيلوغرام) والتي شملت كل من (اليوريا، الكرياتنين، مضادات الاكسدة الكلية، الابيلين)، كما درسنا تأثير الابلين (الحزمة البروتينية A) المحقون باطنياً على وزن الجسم في ذكور الجرذان السليمة والمصابة بإصابة الكلى الحادة، وقد تم دراسة تأثير الابلين (الحزمة البروتينية A) المعزولة لدى ذكور الجرذان السليمة والمصابة بإصابة الكلى الحادة بتركيزين هما (٥٠ مايكروغرام/ كيلوغرام/يوم)، (١٠٠ مايكروغرام/ كيلوغرام/يوم)، حيث اظهرت النتائج بعد الاسبوع الخامس من المعاملة بالابلين (الحزمة البروتينية A) المعزول والمنقى جزئياً من بلازما الإنسان وبجرعة (٥٠ مايكروغرام/ كيلوغرام/يوم)، وجود انخفاض معنوي في مستوى كل من اليوريا والكرياتنين في حين لاحظنا وجود ارتفاع معنوي في مستوى مضادات الاكسدة الكلى والابلين رافقه ارتفاع معنوي في وزن الجسم، في حين لاحظنا وجود انخفاض معنوي في مستوى كل من اليوريا والكرياتنين بنسبة اعلى بعد الاسبوع الخامس من المعاملة بالابلين (الحزمة البروتينية A) المعزول والمنقى

جزئياً من بلازما الإنسان وبجرعة (١٠٠ مايكروغرام/ كيلوغرام/ يوم) مع ظهور ارتفاع معنوي بنسبة اعلى في مستوى كل من مضادات الاكسدة الكلى و الابلين وكذلك في وزن الجسم في كل من الجرذإن السليمة والمصابة بإصابة الكلى الحادة المستحدث بالاثيلين كلايكول (1.0%/كيلو غرام).

القسم الثاني وهو الجزء الذي تم به دراسة المتغيرات النسيجية لعضو الكلى في حيوانات التجارب الجرذان البيض, حيث لاحظنا عودة التغيرات النسيجية الكليوية إلى الحالة الطبيعية او القريبة من الطبيعية باستخدام الجرعة (100 مايكروغرام/ كيلوغرام/ يوم) من الابلين (الحزمة البروتينية A) بنسبة اعلى من الجرعة (٥٠ مايكروغرام/ كيلوغرام/ يوم).

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

تقييم وتنقية الابلين وعلاقته ببعض المتغيرات الكيموحيوية في مرضى إصابة الكلى الحاد في محافظة نينوى

انوار صباح مجيد نصرالله العطار

اطروحة دكتوراه

الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة ليلى عبدالله مصطفى

١٤٤٥هـ ٢٠٢٤م