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

التوصيف الجزيئي لجين PKD1 وبعض المتغيرات الكيميائية الحياتية لدى مرضى الكلية متعددة الأكياس

يمامة عباس زيدان مطر الجنابي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ الدكتور اويس موفق حامد الحسنيّ

١٤٤٤هـ ٢٠٢٣م

الخلاصة:

مرض الكلية متعدد الأكياس(Polycystic Kidney Disease (PKD مرض وراثي يصيب الكلية، ويعد مرض PKD أحد أكثر أمراض الكلية الوراثية شيوعاً التي تصيب الملايين في جميع أنحاء العالم.وFlix Lejars أول من أستعمل مصطلح PKD في سنة ١٨٨٨، وقد عرف مرض PKD من خلال الأكياس النامية بصورة متزايدة داخل الكلية،يحدث مرض ADPKD(Autosomal Domuinant polycystic Kidney Disease) بسبب طفرات في جين PKD1 بنسبة ٨٥٪،أو بسبب طفرات في جين PKD2 بنسبة ١٥٪، وتؤدي الطفرات في جين PKD1 أو جين PKD2 إلى ظهور أنماط ظاهرية مختلفة للمرض. و تهدف هذه الدراسة إلى تحديد العلاقة بين التباين الوراثي للجين PKD1 وحالات الاصابة بمرض الكلية المتعدد الأكياس السائد في مدينة دهوك.

شملت الدراسة الحالية ٩١ شخصا تراوحت أعمارهم بين(٢٠-٥٥) سنة من المراجعين لمركز الكلية في محافظة دهوك في مدة زمنية بدأت من شهر حزيران إلى شهر أيلول من سنة ٢٠٢٢،وتم تقسيم العينات على مجموعتين بالاعتماد على النتائج الكيموحيوية، المجموعة الأولى شملت ٢٠ عينة عُدَت كمجموعة سيطرة والمجموعة الثانية شملت ٧١ مريضاً مصاباً بأمراض كلوية، تم أخذ ٥ مل من الدم الوريدي وقسمت عينة الدم إلى ثلاثة اقسام، ووضع القسم الأول في أنابيب معEDTA مانع للتجلط لاستخراج الحمض النووي، والقسم الثاني وضع في انابيب ابندروف حاوية على مادة الترايزول من اجل استخلاص الـ RNA أما القسم الاخير وضع في أنابيب خالية من أي مضاد للتخثر لفصل مصل، دم وحدد التباين الوراثي للجين(G\C) PKD1 بواسطة تقنيةTetra-ARMS-PCR وحدد تتابع النيوكلوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية الـ DNA Sequencing وحُلل مستوى التعبير الجيني للجين PKD1 بالاعتماد على تقنية الـ RT-PCR و قياس مثيلة الـ DNA في بادئ الجين PKD-1 تم قياس المؤشرات الكيموحيوية المرتبطة بوظائف الكلية والكبد والايضية (Glucose – Triglycerides- Cholesterol- Albumin- Urea- Creatinine- Calcium-ALT(Alanine Aminotransferase)-AST(Aspartate Aminotransferase) -total bilirubin).

وفقا لنتائج الدراسة تبين وجود تباين في نسبة المشاهدة الأليلية، وكذلك تكرار الأنّماط الوراثية المختلفة للجين PKD1،إذ أظهرت النتائج لمرضى ADPKD إنّ قيمة تكرار النمط الوراثي الطبيعي السليم(wild genotype) GG كانت بنسبة ٤٢٪ وهي النسبة الأعلى مقارنة بالنمط الوراثي الطافر(mutant genotype) CC،الذي تكون نسبته ٢٧٪. أما النمط الوراثي المتغاير (Hetero genotype) GC فكانت نسبته ٣١٪. مقارنة مع مجموعة السيطرة اذ كانت النسبة المئوية للانماط الوراثية المختلفة ٨٥٪ للنمط الوراثي الطبيعي و١٠٪ للنمط الوراثي المتباين و ٥٪ للنمط الوراثي الطافر. كما بينت نتائج اختبار تسلسل النيوكليتيدات لجين PKD1 وجود اختلافات غير مسجلة في تسلسل عدد من النيوكليوتيدات، وكذلك سُجل نمط وراثي جديد للجين PKD1 ضمن عينات الدراسة في

المركز الوطني للمعلومات الوراثية NCBI،وخُصص له الرقم التعريفي GenBank: LC750300.1، و أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض في مستوى التعبير الجيني للجين PKD1 لدى مرضى ADPKD مقارنة مع مستوى التعبير الجيني لدى عينات السيطرة. اذ كان معدل التعبير الجيني لمجموعة السيطرة Δ ΔCT= 1.0 اما بالنسبة لمجموعة المرضى فقد كان معدل التعبير الجيني Δ ΔCT = 0.38، كما أظهرت نتائج الاختبار التابع لعملية مثيلة الـ DNA في بادئ الجين PKD1 بان DNA methylated متواجدة في جميع عينات المرضى الذين اجري عليهم الاختبار وبنسبة ٩٠٪ مقارنة بمجموعة السيطرة التي انعدم فيها حدوث المثيلة لبادئ الجين المدروس بينما بينت النتائج وجود الحزم التابعة لعملية الـ unmethylated في جميع العينات المرضى مع الاصحاء وبنسبة ١٠٠٪، كما أظهرت نتائج الدراسة ارتفاع في تركيز الكوليسترول و الكلوكوز والدهون الثلاثية بمصل الدم لدى مرضى ADPKD مقارنة بمجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$. فكانت نسبة الكلوكوز لدى المرضى كانت 270 mg/dl مقارنة بالأصحاء اذ كانت النسبة 105 mg/dl. وكانت مستويات الدهون الثلاثية(Triglycerides) لدى المرضى393 mg/dl مقارنة بالأصحاء اذ كانت النسبة 95 mg/dl. ومستويات الكوليسترول(Cholesterol) لدى المرضى كانت 248 mg/dl مقارنة بالأصحاء اذ كانت النسبة 125 mg/dl. ولم يلحظ أي تغاير كبير في مستوى الألبومين في مصل الدم لدى مرضى ADPKD اذ كانت النسبة لدى المرضى 4.39 mg/dl حيث تكون ضمن المعدل الطبيعي4.50 mg/dl. نستنتج من هذه الدراسة ان التباين الوراثي المدروس التابع للجين PKD1 يعتبر من المسببات الرئيسية للإصابة بمرض الكلية متعدد الأكياس السائد لدى عينات الدراسة.

ABSTRACT

Polycystic Kidney Disease (PKD) is a genetic disease of the kidneys. PKD is one of the most common hereditary kidney diseases affecting millions worldwide. Flix Lejars was the first to use the term PKD in 1888, and PKD was identified as bilateral cysts growing inside the kidneys (ADPKD is caused by mutations in the PKD1 gene in 85% or due to mutations in the PKD2 gene in 15%. Mutations in the PKD1 gene or The PKD2 gene results in indistinguishable disease phenotypes; however, patients with PKD2 gene mutations often present with the disease later in life and have a better prognosis for the disease. Predominant polycystic kidneys in Dohuk city.

The current study included 71 patients between the ages of (20-55) years, who visited the kidney center in Dohuk Governorate, in a period of time ranging from June to September of 2022. The samples are divided into two groups depending on the biochemical results. The first group included 20 samples that were considered as a group. A control and the second group included 71 patients with renal disease. 5 ml of venous blood was taken from the two groups above, the blood sample was separated into three parts, and the first part was placed in tubes with EDTA anticoagulant for DNA extraction, and a part was placed in Eppendorf tubes containing trisol from In order to extract the RNA and the last part, it was placed in tubes devoid of any anticoagulant to separate the blood serum. The genetic variation of the (G/C) PKD1 gene was determined by the Tetra-ARMS-PCR technique, and the nucleotide sequence of the amplified pieces was determined based on the DNA Sequencing technique and the expression level of the PKD1 gene was analyzed based on on technique The RT-PCR and the measurement of DNA methylation in the primer of the PKD-1 gene were measured. bilirubin).

According to the results of the study, it was found that the allelic observation rate, as well as the recurrence of different genotypes of the PKD1 gene, as the results showed that for ADPKD patients, the recurrence value of the normal (wild

genotype) GG was 42%, which is the highest percentage compared to the CC (mutant genotype), which has a rate of 27%. %. As for the hetero-genotype, GC was 31%. Compared with the control group, the percentage of different genotyp es was 85% for the normal genotype, 10% for the variant genotype, and 5% for the mutant genotype. The results of the sequencing test for the amplification of the PKD1 gene also showed the presence of unregistered differences in the sequence of a number of nucleotides, and a new genotype was recorded. The PKD1 gene was included in the study samples at the National Center for Genetic Information NCBI and was given the GenBank ID: LC750300.1. The results of the study showed a decrease in the level of gene expression of the PKD1 gene in ADPKD patients compared to the level of gene expression in control samples. Control Δ ΔCT = 3.2 As for the patient group, the gene expression rate was Δ ΔCT = 0.35, and the results of the test following the DNA methylation process in the primer of the PKD1 gene showed that methylated DNA was present in all samples of the patients who were tested by 90% compared to the control group In which there was no methylation of the studied gene initiator, while the results showed the presence of bundles belonging to the unmethylated process in all samples, patients with healthy ones, at a rate of 100%. ≤0.05. The glucose level in patients was 270 mg/dl compared to healthy subjects, when the ratio was 105 mg/dl. The levels of triglycerides (triglycerides) in patients were 393 mg/dl compared to healthy subjects, when the ratio was 95 mg/dl. dl). Cholesterol levels in patients were 248 mg/dl compared to healthy subjects, when the ratio was 125 mg/dl. No significant change was observed in the level of albumin in serum in patients with ADPKD, as the ratio in patients was 4.39 mg/dl. Where it is within the normal range (4.50 gm / dl). We conclude from this study that the studied genetic variation of the PKD1 gene is one of the main causes of polycystic kidney disease prevalent in the study samples.

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

Molecular Identification of PKD1 gene and certion biochemical parameters in patients with polycystic kidney disease

Yamamah Abas Zedan Aljanabi

M.Sc. Thesis
In
Biology / Zoology

Supervised By
Professor
Dr. Owayes Muaffaq Hamed Al-Hassani

1444 A.H. **2023 A.D.**