

University of Mosul  
College of Science



# **Biochemical and Molecular Assessment for Number of Biomarkers in Children and Adolescents with Obesity**

**Hala Abid Alhadi Salih**

Ph.D. Thesis

**Biology / Zoology**

Supervised By

Assistant Professor

**Dr.Sarab Daoud Suleiman**

**2020 A.D.**

**1442 A.H.**

## Summary

This study includes (120) participants aged from (6-18) years, distributed into four groups (30) donors in each one , The first group includes children aged from (6-12) years with normal weights and body mass index ranged from (15.3-16) kg/m<sup>2</sup> and this group considered as children control group . The Second group includes obese children, their body mass index ranged from (22.8-24.5) kg/m<sup>2</sup>, while the third one includes adolescents aged from (12-18) years with normal weights and thier body mass index ranging from (19.1-22.3) /kg/m<sup>2</sup>. And this group considered as adolescents control for the fourth group that includes obese adolescents their body mass index ranging between (29.1-33.7) kg/m<sup>2</sup>. Blood samples of all these groups had been collected from the National Center of Obesity in Mosul from May 2018 to March 2019. The crucial aims of this study were to demonstrate obesity causes by measuring some of biochemical and biomolecular indicators. Biochemical indicators were distributed into three sections lipids profile which include triglycerides cholesterol, high-density lipoproteins, and low density lipoproteins, some hormones related to obesity such as leptin, resistin and spexin in addition to some oxidative stress enzyme like catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and nicotinamide adenine dinocletide phosphate oxidase4). Biomolecular obesity causes were focusing on the spexin coding gene sequences mutations that lead to heterogeneity in some single nucleotides, especially in the 5- and 3-Untranslated regions , which regarded as gene expression regulated regions in obese children and adolescents for the first time. The results of this study showed a significant increase at probability level ( $P < 0.01$ ) in the lipids profile of cholesterol, triglycerides and low-density lipoproteins in obese children and adolescents compared with their control groups, except for high-density lipoproteins that did not show any significant differences between obese children and adolescents compared with their control groups. The results also showed a significant increase in both leptin and resistin

hormones in obese children and adolescents compared with control groups, and significant decrease in the spexin hormone in obese children and adolescents compared with control groups. Some oxidative stress related enzymes such as superoxide dismutase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NADPH Oxidase 4) and catalase showed a significant increase in their activities of obese children and adolescent's serum compared with control groups but glutathione peroxidase enzyme showed a significant decrease in both obese children and adolescents compared with the two control groups. This study also included DNA extraction from children and adolescents blood samples from all groups, then ten samples from each group had been chosen randomly and analyzed by polymerase chain reaction (PCR), results revealed the presence of the spexin coding gene in all samples.

Sequence analysis was then accomplished for three randomly selected samples for each group to investigate any mutation in the nucleotide sequences in the untranslated regions 5' and 3'-UTRs of spexin coding gene that regulate gene expression. Results showed a comparable match with the nucleotides sequence for this gene which were recorded at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) in both regions 5' and 3'UTR in normal weight children and adolescents, while in obese children single nucleotides polymorphism (SNP) in 5'-UTR had been recorded for the first time, these variations were: transitional type, (G>A) and (A>G) in the sites (112, 113) respectively, transversion type (A>C) in the site (117) for the first sample, second sample variations were: single transition in the site of nucleotide (117) and two transversion (A>C) and (A>T) in nucleotide sites (118 and 126) respectively. While the third sample variations were transition type C>T in site (111).

Also variation type transversion (A>C) at nucleotide site 1507 in obese children at 3'-UTR had been recorded.

In normal weight adolescents also, there were no differences between their gene sequences and the national center for biotechnical Information (NCBI) gene sequences in both regions 5- and 3-UTR, while in obese adolescents variations in the 5-UTR region Transition type (A<G) at nucleotide site 98 and (G<C) (Transvirision) at nucleotide site (81) in one samplonly had been detected. But in 3-UTR region, transvirision variation was recorded in Nucleotide site (1507) in all obese adolescents samples, which confirms the importance of this SNPs as possible causes of adolescents obesity. The current study also showed that spexin hormone plays a vital role in the children and adolescents obesity due to its low expression in obese individuals compared with the normal weight ones, study results also revealed for the first time presence of mutations in regulatory region of spexin coding gene.

## الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية مشاركة (١٢٠) متبرع تراوحت اعمارهم بين (٦-١٨) سنة وزعوا الى اربعة مجاميع شملت كل مجموعة (٣٠) متبرع ، المجموعه الاولى شملت اطفال تراوحت اعمارهم بين (٦- ١٢) سنة ذوي اوزان طبيعيه ، معدل مؤشر كتلة الجسم لديهم تراوح بين (١٥.٣-١٦) كغم/م<sup>٢</sup> و عدت هذه المجموعة مجموعته سيطره لاطفال المجموعه الثانيه التي تضمنت اطفال يعانون من السمنه ، معدل مؤشر كتلة الجسم لديهم يتراوح بين (٢٢.٨-٢٤.٥) كغم/م<sup>٢</sup>،بينما تضمنت المجموعه الثالثه مراهقين تراوحت اعمارهم بين (١٢-١٨ سنة ) ومن ذوي الاوزان الطبيعيه تراوح مؤشر كتلة الجسم لديهم بين (١٩.١-٢٢.٣) كغم /م<sup>٢</sup> و عدت هذه المجموعه مجموعته سيطره للمراهقين، اما ا لمجموعه الرابعه فقد كان افرادها من المراهقين الذين يعانون من السمنه و تراوح مؤشر كتلة الجسم لديهم تراوح بين (٢٩.١-٣٣.٧) كغم/م<sup>٢</sup>. جمعت عينات الدم للاطفال والمراهقين من ذوي الاوزان الطبيعيه و من الذين يعانون من السمنه من المركز الوطني للسمنه في مدينة الموصل، واستغرقت فترة جمع العينات من شهر أيار ٢٠١٨ الى شهر أذار ٢٠١٩.

استهدفت الدراسه الحاليه التحري عن اسباب السمنه من خلال قياس بعض المؤشرات الكيموحيويه والبايوجزيئية، قسمت مؤشرات التحري الكيموحيويه الى ثلاث اقسام وهي مرتسم شحميات الدم (الكوليسترول الدهون الثلاثيه والبروتينات الدهنيه عاليه الكثافه والبروتينات الدهنيه واطئة الكثافه) وبعض الهرمونات المتعلقة بالسمنه (اللبتين،الرزسستين والسبيكسين) والانزيمات المتعلقة بالاجهاد التأكسدي كاتليز ، سوبراوكسياد ديسميوتيز ، الكلوتاثيون بيروكسيديز ، و نيكوتينايد أدينين ثنائي نوكليويد الفوسفات اوكسيديز (٤). اما مؤشرات السمنه البايوجزيئيه فتم التحري عنها من خلال تشخيص وجود جين السبكسين المكتشف حديثاً في جميع المجاميع والتحري عن وجود بعض الطفرات في تسلسلات هذا الجين التي تؤدي الى حصول تغايرفي بعض النيوكليوتيدات المفرده خاصة في المناطق غير المشفرة التي تقع في النهايه رقم ٥ والنهايه رقم ٣ تعد هذه المناطق مناطق منظمة للتشفير الجيني في الاطفال والمراهقين الذين يعانون من السمنه ومقارنتها مع مجموعتي السيطرة .

اظهرت النتائج لهذه الدراسه وجود زياده معنويه عاليه عند مستوى الاحتمالية ( $P<0.01$ ) في المرتسم الشحمي لكل من الكوليسترول والدهون الثلاثية والبروتينات الدهنيه الواطئة الكثافه لدى الاطفال والمراهقين الذين يعانون من السمنه مقارنة مع مجموعتي السيطره لهذه المؤشرات باستثناء البروتينات العاليه الكثافه التي لم تظهر فروقات معنويه بين الاطفال الذين يعانون من السمنه وبين مجموعته السيطره التابعه لهم ، بينما سجل وجودارتفاع معنوي لدى المراهقين الذين يعانون من السمنه بالمقارنه مع مجموعته السيطره التابعه لهم .

كما اظهرت النتائج وجود زياده معنويه عند مستوى الاحتمالية ( $P<0.01$ ) في كل من هرمون اللبتين (Leptin) وهرمون الريزيسستين (Resistin) لدى كل من الاطفال والمراهقين الذين يعانون من

السمنة بالمقارنه مع مجموعتي السيطرة بينما كان هناك انخفاض معنوي ( $P < 0.01$ ) في هرمون السبسين (Spexin) عند الاطفال والمراهقين الذي يعانون من السمنة بالمقارنه مع مجموعتي السيطرة .

اما بالنسبة لنتائج الانزيمات المتعلقة بالاجهاد التأكسدي فوضحت الدراسة وجود زياده معنويه عند مستوى الاحتمالية ( $P < 0.01$ ) في فعالية انزيمات سوبر اوكسيديد ديسميوتيز (Superoxide dismutase) وانزيم نيكوتيناميد ادينين ثنائي نوكليويتيد الفوسفات اوكسيديز (NADPH Oxidase 4) وانزيم الكاتليز (Catalase) في مصل الاطفال والمراهقين الذين يعانون من السمنة اذا ماقورنت مع نتائج مجموعتي السيطرة اما نتائج انزيم الكلوثاين بيروكسيديز (Glutathione peroxidase) فقد اظهرت انخفاض معنوي ( $P > 0.01$ ) في فعالية الانزيم في كل من الاطفال والمراهقين بالمقارنه مع مجموعتي السيطرة

كما شملت هذه الدراسة استخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) من عينات دم الاطفال والمراهقين من كل المجاميع ، واجري بعد ذلك تفاعل البلمره المتسلسل (PCR) لعشرة ١٠ عينات اخذت عشوائيا من كل مجموعته واظهرت النتائج وجود جين السبسين Spexin في جميع العينات .

ثم اجري اختبار تتابع القواعد النروجينه Sequence analysis لثلاثة عينات اختيرت عشوائيا من كل مجموعته للتحري عن وجود تغيرات في تسلسل النيوكليوتيدات (SNPs) المفرده في المناطق غير المشفرة (UTR<sup>3</sup>), (UTR<sup>5</sup>) التابعه لجين السبسين (Spexin) والمنظمة للتعبير الجيني واظهرت النتائج وجود تطابق تام مع تسلسل النيوكليوتيدات لهذا الجين المسجل في المركز الوطني للمعلومات التقنيه الحيويه NCBI لدى الاطفال من ذوي الاوزان الطبيعيه في كلا المنطقتين UTR<sup>5</sup> و UTR<sup>3</sup>، بينما اظهرت الدراسة الحاليه ولاول مرة وجود تغيرات في بعض النيوكليوتيدات المفرده (SNP) لدى الاطفال الذي يعانون من السمنة في منطقه (UTR<sup>5</sup>) وكانت من نوع التغيرات الانتقاليه (transition) G>A و A>G في مواقع النيوكليوتيدات (١١٢، ١١٣) على التوالي، وتغاير من نوع A>C التحويل (transversion) في موقع النيوكليوتيد (١١٧) (العينة الاولى اما العينة الثانية فقد كانت التغيرات كالاتي تغاير انتقالي transition في موقع النيوكليوتيد (١١٧) وتغايران (transversion) من نوع التحويل A>C و A>T في مواقع النيوكليوتيدات (١١٨ و ١٢٦) على التوالي.

بالنسبه للعينة الثالثة فقد كانت التغيرات من نوع C>T transition في موقع النيوكليوتيد (١١١)

اما بالنسبة لمنطقه الجين غير المشفرة UTR<sup>3</sup>- فقد توافقت نتائج تسلسل الجين عند الاطفال من ذوي الاوزان الطبيعيه مع تسلسل الجين المسجل في NCBI وسجل في هذه الدراسة ولاول مرة تغاير واحد من نوع التحويل (A>C transversion) في موقع النيوكليوتيد ١٥٠٧ عند الاطفال الذين يعانون من السمنة.

في المراهقين من ذوي الاوزان الطبيعيه لم يسجل اي اختلاف بين تسلسل الجين لديهم بالمقارنه مع تسلسل الجين في المركز الوطني للمعلومات التقنيه الحيويه في كلا المنطقتين ٥ UTR و ٣ UTR بينما في المراهقين الذين يعانون من السمنه فقد سجلت ولأول مرة تغيرات في منطقة ٥ UTR وكانت تغير من نوع A<G (Transition) في موقع النيوكليوتيد ٩٨ وتغير من نوع G<C (Transvirision) في موقع النيوكليوتيد ٨١ في عينة واحدة فقط من مجموع الثلاث عينات التي تم ارسالها اما في منطقة ٣ UTR فقد سجل تغير من نوع A>C (Transvirision) في موقع النيوكليوتيد ١٥٠٧ في جميع عينات المراهقين الذين يعانون من السمنه مما يؤكد اهمية هذا التغير المؤدي الى السمنة في المراهقين. كما اظهرت الدراسة الحالية ان هرمون السيكسين من الهرمونات المهمة والتي تلعب دورا حيويا في سمنة الاطفال والمراهقين حيث ان انتاجه يقل كثيرا بالمقارنة مع اقرانهم ذوات الاوزان الطبيعية وقد يعزى هذا الى حصول طفرات في الجين المشفر لهذا الهرمون خاصة المناطق المنظمة للتشغير او التعبير الجيني المتمثلة بالتسلسلات في النهاية ٥ والنهائية ٣ والتي اكدتها هذه الدراسة ولأول مرة.



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة الموصل  
كلية العلوم

التقييم الكيموحيوي والجزئي لعدد من الدلائل الحيويه  
عند الاطفال والمراهقين البدينين

هلا عبدالهادي صالح

دكتوراه فلسفة  
علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف  
الاستاذ المساعد  
د. سراب داؤد سليمان