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

Study of Peroxiredoxin 3 Enzyme for Six types of Spontaneous Abortion Patients and its Relationship to Biochemical Parameters and Factors Affecting It with Isolation from Blood Serum

Israa Hikmat Younis Majeed Al-Hamdani

Ph. D. Thesis

Chemistry/ Biochemistry

Supervised by

Prof. Dr. Luay Abed Ali Al-Helaly

2023 A.D **1445 A.H**

ABSTRACT

Abortion (Miscarriage) is one of the most important complications facing pregnancy and as a result of its negative impact on many physical and psychological aspects as well as the large number of environmental pollutants and the unhealthy lifestyle prevalent in recent times in addition to the increasing number of cases of abortion, we have highlighted in this study the possible causes and their relationship to the different types of abortion.

This study involves the measurement of Peroxiredoxin 3 (Prx3) in spontaneous abortion patients. The patients in the recent study were clinically diagnosed and sorted into six types of abortion: Threaten abortion, Inevitable abortion, Incomplete abortion, Complete abortion, Missed abortion, and Recurrent abortion, in addition to determination for (31) biochemical parameters which include: Progesterone hormone (P4), Antiphospholipid antibodies (aPL), Anticardiolipin antibodies (aCL); and some Essential and Toxic metals, beside of, some Liver Enzymes with Oxidant and Antioxidant biomarkers, Glucose (Glu.), Lipid profile and some Proteins. The present study has been performed on (270) participants of childbearing age: (120) women with spontaneous abortion, (40) healthy non-pregnant women, (40) healthy pregnant women, in addition to (70) samples used for isolation Prx3 enzyme from apparently healthy non-pregnant women with no previous history of abortion. The study was divided into three main parts as follows:

First part (Clinical Study): This study involved determining the level of Prx3 enzyme in the blood serum of patients with spontaneous abortion, apparently healthy pregnant and non-pregnant women. The results exhibited a significant decrease in the Prx3 level in spontaneous abortion patients as compared with the healthy pregnant and non-pregnant groups; similarly, there was a significant decrease in the level of Prx3 in each six types of spontaneous abortion with the lowest value found in inevitable abortion patients. The level of Prx3 enzyme was also affected by advancing gestational age and with an increased number of pregnancies, whereas not affected by progressing maternal age, family history, and number of previous abortion in patients group.

The results of the comparison between the abortion patients and healthy non-pregnant groups for biochemical parameters showed a significant increase in the levels of P4, aPL, aCL, toxic metals (Arsenic (As), Cadmium (Cd), Mercury (Hg)), Aspartate aminotransferase (AST), oxidant markers (Peroxynitrate ($ONOO^-$),

Malondialdehyde (MDA)), Total cholesterol (TC), Low density lipoprotein-Cholestrol (LDL-C) and albumin (alb.), whereas the levels of essential metals (Calcium (Ca), inorganic phosphorus (P)) and glutathione (GSH) showed a significant decrease.

The results of the comparison between the abortion patients and healthy pregnant groups for biochemical parameters also showed a significant increase in the levels of aPL, aCL, Fe, toxic metals (As, Cd, Hg), liver enzymes (AST, ALT, AST/ALT ratio), oxidant markers ($ONOO^-$, MDA), UA, TB, Glu., TP, Alb., and Glo., whereas the levels of P4, essential metals (Ca, P), ALP, GSH, TG, and VLDL-C showed a significant decrease.

Additionally, the effect of gestational age was studied among the abortion patients, the results exhibited a significant increase in the levels of P4, and lipid profile (TC, HDL-C, LDL-C) in the blood serum of abortion patients with progression gestational age, but the levels of essential metals (Fe, Ca, Ca/P ratio), Hg, GSH, UA, TP, and Alb. showed a significant decrease. The present findings indicated higher levels of P4, ALP, TG, and VLDL-C in the blood of abortion patients having a family history of abortion, but other biochemical parameters exhibited not significant differences.

Also, the effect of the mother's age was studied among abortion patients and the results exhibited a significant increase in the levels of aCL, Fe, Ca/P ratio, As, ALT, $ONOO^-$, lipid profile (TC, TG, LDL-C, VLDL-C) and Glo. for abortion patients with progression of maternal age, and a significant decrease in the levels of P, GSH and Alb. In addition, the current results exhibited a significant increase in the levels of aPL, aCL, toxic metals (As, Cd, Hg), ALT, AST/ALT ratio, oxidant markers ($ONOO^-$, MDA), TB, IB, and Glo. in abortion patients with increasing No. of previous abortion, but the level of GSH was observed a significant reduction.

Similarly, the gravida impact was studied among the abortion patients and the results showed a significant increase in the levels of aCL, Fe, Ca/P ratio, As, Hg, AST, oxidant markers ($ONOO^-$, MDA), UA, TB, IB, Glu., and Glo. in the blood serum of abortion patients with an increasing number of pregnancies, and a significant decrease in the levels of P and GSH was noticed.

The abortion type's impact displayed a significant elevation of Ca/P ratio and ALT was shown in threaten abortion, and a significant reduction in P level. The result of TB and aPL revealed a significant increase in an inevitable abortion. UA level recorded a significant elevation in an incomplete abortion, while P4, TG and HDL-C showed a significant reduction. A significant increase of Glu. level was

noticed in a complete abortion. A significant elevation of As and AST was observed in missed abortion, and a significant reduction in the level of GSH. The aPL, aCL, Fe, Cd, Hg, oxidant markers ($ONOO^-$, MDA), TP, and Glo., levels demonstrated a significant elevation in recurrent abortion. The most type of abortion affects was detected in the recurrent spontaneous abortion, especially in oxidative stress markers and toxic metals.

The result exhibited a positive correlation of Prx3 level with each of GSH, UA, TP, and Albumin, whereas a negative correlation was revealed with As, oxidant markers ($ONOO^-$, MDA) and AI in abortion group.

Second part (Isolation Study): It involves isolation and partial purification of the Prx3 from the blood serum of apparently healthy non-pregnant women using various biotechniques, which include sedimentation with 65% ammonium sulfate, dialysis, and ion exchange chromatography, where only one highly activity main peak is separated by the DEAE-cellulose ion exchange technique, and the number of purification reaches 40 times. Concerning the gel filtration by using Sephadex G-50, it has been found that there was one peak with high activity of Prx3, and the number of purification times for the peak reached 77 times and the percentage of protein recovery was 37.5 %. In addition, the approximate molecular weight of Prx3 isolated and partially purified from serum was (26187.8) Dalton of one peak using gel filtration chromatography (Sephadex G-50), while one band was appeared using SDS-PAGE technique with molecular weight (22031.3) Dalton.

Third part (Effect of Chemical Compounds & Drugs on Prx3 Study) : It involves the study effect of some chemical compounds and therapeutic drugs on Prx3. The results exhibited a decrease in Prx3 level in the presence of (5 mM) for Cadmium chloride, Cobalt chloride, Copper chloride, Lead chloride, Manganese oxide, Mercuric chloride, Nickel chloride, Potassium cyanide, and Sliver nitrate, with the highest inhibitory percentage was found in Mercuric chloride, Potassium cyanide and Lead chloride.

The effect of drugs gives different activating and inhibitory ratios. The results showed an increase in Prx3 level in the presence of (5 mM) for Ascorbic acid and Thiamin. Whereas, a decrease in the presence of Acetaminophen, Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin, Ibuprofen, Mefenamic acid, and Tetracycline, with the highest inhibitory percentage was found in Mefenamic acid and Ibuprofen.

الخلاصة

يعد الإجهاض (الاسقاط) من اهم المضاعفات التي تواجه الحمل لما له من تأثير سلبي على العديد من النواحي الجسدية والنفسية ولكثرة الملوثات البيئية ونمط الحياة غير الصحي المنتشر في وقتنا الحالي وبالنظر لتزايد اعداد حالات الإجهاض فقد سلطنا الضوء في هذه الدراسة على المسببات المحتملة وعلاقتها بالأنواع المختلفة للإجهاض.

تضمنت هذه الدراسة قياس مستوى انزيم البيروكسي ردوكسين 3 (Prx3) في مرضى الإجهاض التلقائي والمشخص سريريا والمصنف الى 6 انواع من الإجهاض والمتضمنة: الإجهاض المهدد، الإجهاض الحتمي، الإجهاض غير الكامل، الإجهاض الكامل، الإجهاض المنسي، والإجهاض المتكرر، بالإضافة إلى تقدير (31) متغيرا كيموحيوي والتي شملت: هورمون البروجسترون (P4)، الاجسام المضادة للدهون الفوسفاتية(aPL)، الاجسام المضادة للدهون القلبية (aCL)؛ وبعض المعادن الاساسية والسامة، بالإضافة الى بعض انزيمات الكبد ومؤشرات الاكسدة ومضاداتها والكلوكوز، وصورة الدهون الكاملة وبعض البروتينات. اجريت هذه الدراسة على (270) مشاركة في سن الانجاب: (120) امرأة مصابة بالإجهاض التلقائي، (40) من النساء الاصحاء غير الحوامل و (40) من النساء الاصحاء الحوامل، بالإضافة الى (70) عينة لعزل إنزيم Prx3 من النساء الأصحاء ظاهريا غير الحوامل وليس لديهم تاريخ إجهاض سابق، تم تقسيم الدراسة إلى ثلاثة أجزاء رئيسية على النحو التالي:

الجزء الأول (الدراسة السريرية): تضمنت هذه الدراسة تقدير مستوى إنزيم Prx3 في مصل الدم لدى مرضى الإجهاض التلقائي والنساء غير الحوامل والحوامل الاصحاء ظاهريا، أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في مستوى Prx3 في مرضى الإجهاض التلقائي مقارنة مع مجموعة الاصحاء الحوامل وغير الحوامل؛ وبصورة مماثلة كان الانخفاض معنويا للـ Prx3 في كل من المجاميع الستة للإجهاض التلقائي واقل قيمة وجدت لدى مرضى الإجهاض الحتمي. كما وتأثر مستوى Prx3 بتقدم عمر الحمل وزيادة عدد مرات الحمل ولم يظهر اي تأثير مع تقدم عمر الام والتاريخ الوراثي للعائلة وعدد الإجهاضات السابقة في مجموعة المرضى.

اظهرت نتائج المقارنة بين مجموعتي مرضى الإجهاض والاصحاء غير الحوامل للمتغيرات الكيموحيوية ارتفاعا معنويا في مستويات P4 وaPL وaCL والمعادن السامة (الزرنيخ (As) والكادميوم (Cd) والزئبق (Hg)) وانزيم اسبارتيت امينوترانسفيريز (AST) ومؤشرات الاكسدة (بيروكسي نيتريت

(-ONOO) ومالوندايالديهايد (MDA)) والكوليستيرول الكلي (TC) والبروتين الدهني الواطئ الكثافة للكوليستيرول (LDL-C) والالبومين (Alb)، بينما اظهرت مستويات المعادن الاساسية (الكالسيوم (Ca) والفسفور اللاعضوي (P)) والكلوتاثايون (GSH) انخفاضا معنويا. كما اظهرت نتائج المقارنة بين مجموعتي مرضى الإجهاض والاصحاء الحوامل للمتغيرات الكيموحيوية ارتفاعا معنويا في مستويات aPL وaCL والحديد والمعادن السامة (AS وCd وHg) وانزيمات الكبد (ASTوALT ونسبة ALT/AST) ومؤشرات الاكسدة (-ONOO وMDA) وحامض اليوريك (UA) والبليروبين الكلي(TB) والكلوكوز(Glu) والبروتين الكلي(TP) والالبومين (Alb) والكلوبيولين (Glo)، بينما اظهرت مستويات P4 والمعادن الاساسية (Ca وP) وانزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP) وGSH والكليسيريدات الثلاثية (TG) وVLDL-C انخفاضا معنويا.

بالإضافة الى ذلك تم دراسة تأثير عمر الحمل في مرضى الإجهاض واظهرت النتائج ارتفاعا معنويا في مستويات P4 وصورة الدهون الكاملة (TC وHDL-C وLDL-C) في مصل دم مرضى الإجهاض مع تقدم عمر الحمل، لكن مستويات المعادن الاساسية (Fe وCa ونسبة P /Ca) وHg وGSH وUA و TP وAlb اظهرت انخفاضا معنويا. اشارت النتائج ارتفاع مستوى P4 وALP وTG وVLDL-C في دم مرضى الإجهاض الذين يملكون تاريخ عائلي وراثي في الإجهاض، بينما المتغيرات الكيموحيوية الاخرى لم تظهر اختلافات معنويا.

كذلك تم دراسة تأثير عمر الام لدى مرضى الإجهاض واظهرت النتائج ارتفاعا معنويا في مستويات aCL والحديد ونسبة P/Ca وAs وALT و-ONOO وصورة الدهون الكاملة (TC وTG و LDL-C و VLDL-C) وGlo لدى مرضى الإجهاض مع تقدم عمر الام، ولوحظ انخفاضا معنويا في مستويات P وGSH وAlb. بالإضافة الى ذلك اظهرت النتائج ارتفاعا معنويا في مستويات aPL وaCL والمعادن السامة(As وCd وHg) وALT ونسبة ALT/AST ومؤشرات الاكسدة(-ONOO وMDA) و TB وIB وGlo في مرضى الإجهاض مع زيادة عدد الإجهاضات السابقة، لكن مستوى GSH اظهر انخفاضا معنويا.

وبصورة مماثلة تم دراسة تأثير زيادة عدد مرات الحمل لدى مرضى الإجهاض واظهرت النتائج ارتفاعا معنويا في مستوياتaCL وFe ونسبة P/Ca وAs وHg وAST ومؤشرات الاكسدة (-ONOO وMDA) وUA وTB وIB وGlu وGlo في مرضى الإجهاض مع زيادة عدد مرات الحمل، ولوحظ انخفاضا معنويا في مستويات P وGSH. كشفت تأثير انواع الإجهاض عن ارتفاعا معنويا في نسبة Ca/P وALT في الإجهاض المهدد وانخفاضا معنويا في مستوى P. كما اظهرت نتائج TBوaPL ارتفاعا معنويا في الإجهاض الحتمي. سجل UA ارتفاعا معنويا في الإجهاض غير الكامل، بينما سجل P4 وTG وHLD-C انخفاضا

معنويا. ولوحظ ارتفاعا معنويا في مستوى Glu في الإجهاض الكامل. كما لوحظ ارتفاعا معنويا في As وAST في الإجهاض المنسي، بينما اظهر مستوى GSH انخفاضا معنويا. سجلتaPL وaCL وFe وCd وHg ومؤشرات الاكسدة(-ONOO وMDA) وTP وGlo ارتفاعا معنويا في الإجهاض المتكرر. سجل الإجهاض المتكرر كأكثر انواع الإجهاض تأثيرا وخصوصا في مؤشرات الكرب التأكسدي والمعادن السامة.

اوضحت النتائج ان هناك ارتباط إيجابي لمستوى Prx3 مع كل من GSH وUA وTPوAlb، ولكنه اظهر ارتباطًا سلبياً مع As ومؤشرات الاكسدة(-ONOO وMDA) ومعامل تصلب الشرايين في مجموعة الإجهاض .

الجزء الثاني (دراسة العزل) : تضمن عزل والتنقية الجزيئية لإنزيم Prx3 من مصل دم النساء الاصحاء ظاهريا غير الحوامل، باستخدام تقنيات حيوية مختلفة، والتي تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة 65 % والديلزة وكروماتوكرافيا التبادل الايوني، حيث تم فصل قمة واحدة ذات فعالية عالية بواسطة تقنية التبادل الايوني DEAE– السليلوز، وبعدد مرات التنقية تصل الى 40 مرة. ومن ثم الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-50 ، وقد وجد أن هناك قمة واحدة ذات فعالية عالية من Prx3 ، وبلغ عدد مرات التنقية للقمة 77 مرة وبنسبة استعادة البروتين 37.5 %. بالإضافة الى ذلك، تم ايجاد الوزن الجزيئي التقريبي لـ Prx3 المعزول والمُنقَّى جزئيا من مصل الدم، وقد كان بحدود (26187.8) دالتون لقمة واحدة باستعمال تقنية كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي (Sephadex G-50) وظهور حزمة واحدة باستعمال تقنية الهجرة الكهربائية نوع SDS-PAGE مع الوزن الجزيئي (22031.3) دالتون.

الجزء الثالث (دراسة تأثير المركبات الكيميائية والادوية على Prx3): تضمن دراسة تأثير بعض المركبات الكيميائية والأدوية العلاجية على Prx3، اظهرت النتائج انخفاضا في مستوى Prx3 في وجود (5 ملي مول) من كلوريد الكادميوم وكلوريد الكوبلت وكلوريد النحاس وكلوريد الرصاص واوكسيد المنغنيز وكلوريد الزئبق وكلوريد النيكل وسيانيد البوتاسيوم ونترات الفضة. وأعلى نسبة تثبيطية وجدت عند كلوريد الزئبق وسيانيد البوتاسيوم وكلوريد الرصاص. اعطى تأثير الأدوية نسب تنشيطية وتثبيطيه مختلفة، اذ أظهرت النتائج ارتفاعا في مستوى Prx3 في وجود (5 ملي مول) من حامض الاسكوربيك والثيامين، بينما وجد هناك انخفاضا عند وجود الاسيتامينوفين والأموكسيسيلين والازثرومايسين والسيفالاكسين والايبوبروفين وحامض الميفيناميك والتتراسيكلين وان أعلى نسبة تثبيطية وجدت عند حامض الميفيناميك والايبوبروفين.

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

دراسة إنزيم بيروكسي ردوكسين 3 لدى مرضى الاجهاض التلقائي بأنواعه الستة وعلاقته بالمتغيرات الكيموحيوية والعوامل المؤثرة عليه مع عزله من مصل الدم

اسراء حكمت يونس مجيد الحمداني

أطروحة دكتوراه

الكيمياء/ الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذ الدكتور لؤي عبد علي الهلالي

1445 هـ **2023 م**