جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل/ كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تشخيص الاصابة بطفيلي المقوسات الكوندية في النساء المجهضات و دوره في زيادة تعبير بعض انواع MicroRNAs المسببة لحالات الاجهاض.

فلك عبد الحافظ خطاب عمر

أُطروحة دكتوراه

علوم الحياة / علم الحيوان

إشراف

الاستاذ المساعد

د. نجاح صبحي نايف خطاب

الاستاذ المساعد

د. سعد غانم صالح ياسين

1446 هـ

2024 م

الخلاصة:

خلصت الدراسة الحالية الى معرفة مسببات الاجهاض في النساء المصابات بطفيلي *Toxoplasma gondii* من خلال دراسة عدة متغيرات منها مناعية و جينية و فوق جينية ، إذ اجريت الدراسة في مدينة الموصل للفترة من شهر أيار 2022 ولغاية شهر كانون الثاني 2023 حيث جمعت 100 عينة من صالات العمليات في مستشفى البتول التعليمي للنسائية والتوليد ومستشفى الخنساء التعليمي للولادة والاطفال، كما جمعت 10 عينات من سيدات حوامل أنجبن بصورة طبيعية (كمجموعة سيطرة) ، شملت العينات قطع نسجية من المشيمة ، بالاضافة الى 5 سم3 من الدم، والذي تم فصله الى مصل وتم الاحتفاظ بالعينات في التجميد بدرجة (20−) م° لحين الاستخدام.

اجري إختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالانزيم Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) للكشف عن العينات الموجبة ، و تم التحري الجزيئي لتاكيد تشخيص وجود الطفيلي في العينات باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(Polymeras Chain Reaction(PCR بعد إستخلاص الحمض النووي منقوص الاوكسجين DNA واجراء المحاذاة مع الجين *B1* ، وتم تأكيد ايجابية البعض منهم ، كما تم استخدام تقنية الانصهار العالي الدقة High Resolution Melting Curve RT-HRM و لاول مرة في محافظة نينوى لتصنيف سلالات الطفيلي بالاعتماد على التباين في درجة الانصهار Melting Temprture والذي تم من خلالها تحديد التقارب والتباعد الوراثي بين سلالات الطفيلي حيث تبين وجود اختلاف في تتابع القواعد النيتروجينية في مواقع محددة والتي تمثلت بوجود طفرات وراثية ولوحظ اعلى مستوى للتقارب الوراثي بين السلالة الثالثة والخامسة من خلال تحديد قيمة درجات الانصهار و طبيعة الطفرات الوراثية . كما تم تحديد قيم مستوى هرمونات البروجستيرون Progesteron Hormone وهرمون النمو Growth Hormone في النساء المصابات بالطفيلي ومقارنتها مع النساء السليمة .

استخلص masenger Ribon Nciec Acid (mRNA)وحول إلى الحمض النووي منقوص الاوكسجين المكمل compelementary Deoxyribonucleic acid (cDNA) لغرض الكشف عن التعبير الجنيني Gene Expretion للجينات NF_KB , *VEGF* ,*PLGF* في المضيف، كما استخلص الحمض النووي الريبي الدقيق microRNA (miRNA) وتم تحويله إلى cDNA لغرض الكشف عن نشاط كل من الاحماض النووية الريبية الدقيقة -*miR-146,miR-124,miR-199,miR*

132,miR-215 في داخل جسم المضيف والتي لوحظ تاثرها جميعا بعامل الضراوة للطفيلي (*ROP16*) Roptry Protein16.

أظهرت نتائج الاختبارات ان نسبة الاصابة كانت مرتفعة في الفئة العمرية الاقل من30 سنة اذ بلغت 11% في الفئة العمرية (15-20) سنة ، تلتها 7.4% في الفئة العمرية (26-30) سنة واخير 5.5 % في الفئة العمرية (21-25) سنة ، كما اظهرت نتائج تتابع النيوكليوتيدات للحمض النووي للعنيات الموجبة في التحري الجزيئي تسجيل عزلة للطفيلي بنمط وراثي Type I في مدينة الموصل ضمن بنك الجنيات العالمي في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية National Center Biotechnology Information (NCBI) واعطي الرقم التعريفي له PP723076.1 .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاض مستوى هورمون البروجستيرون في النساء المصابة بالطفيلي (4.75-2.75pg/ml) مقارنة مع النساءالسليمات الحوامل والتي كانت مرتفعة (387.0-232.8pg/ml) اما بالنسبة لهورمون النمو فقد بلغ مستواه في النساء المصابة بالطفيلي (0.20-0.12pg/ml) وفي الحوامل السليمة (0.54-0.11pg/ml) ،كما تبين وجود زيادة في التعبير الجيني لعامل الضراوة *ROP16* والذي ينتجه الطفيلي Type I بالمقارنة مع عامل الضراوة *GRA15* اذ تبين ان الزيادة في نشاط الجين المسؤول عن عامل الضراوة *ROP16* يزداد انتاجه من *T.gondii* والذي يعمل على اعادة تنظيم الوراثة اللاجينية والجينية الخاصة بالمشيمة وان ارتفاع هذا الجين ادى الى التأثير على جينات معينة داخل جسم النساء المصابات بالطفيلي منها تأثيره على عامل النسخ NF_KB اذ بلغ تعبيره في النساء المصابات بالطفيلي (0.13-0.11) بينما بلغ في الحوامل (3.5-3.1) ، كذلك تأثيره على الجين المحفز لتكوين الأوعية الدموية في المشيمة Vascular Endothelyad Growth Factor(VEGF) حيث انخفض الجين المتاثر في النساء المصابات بالطفيلي (0.97-0.85) مقارنة بالنساء الحوامل (2.44-1.81)، كذلك اظهرت نتائج الدراسة الحالية نقصان في نشاط الجين المسؤول عن نمو المشيمة مقارنة مع النساء الحوامل Placental Growth Factor(*PLGF*) اذ بلغ في النساء المصابات بالطفيلي (0.94-0.57) مقارنة مع النساء الحوامل (7.01-5.86).

اظهرت النتائج تأثير *ROP16* على الاحماض النووية الدقيقة microRNAs إذ لوحظ ارتفاع في تعبير الحمض النووي الدقيق *miR-146* في النساء المصابات بالطفيلي (1.31-1.23) بالمقارنة مع النساء الحوامل (1.07-1.06) ، و ارتفاع تعبير الحمض النووي الدقيق *miR-124* في النساء المصابات بالطفيلي (1.34-1.33) مقارنة مع الحوامل (0.43-0.38)، كما ارتفع كذلك تعبير الحمض النووي

الدقيق *miR-199* في النساء المصابات (2.20-2.30) بالمقارنة مع النساء الحوامل (0.64-0.65) ،و ارتفع الحمض النووي الدقيق *miR-132* في النساء المصابات (1.54-1.75) مقارنة مع المجهضات (0.50-0.55)، واخيراً لوحظ زيادة في تعبير الحمض النووي الدقيق *miR-215* في النساء المصابات بالطفيلي (1.62-1.76) مقارنة مع المجهضات (0.90-0.95).

Abstract:

The current study concluded that the etiology of miscarriage in women with Toxoplasma gondii by studying several variants, including immune, genetic and epygenetic. 100 Samples were collected from May 2022 until January 2023, from operating halls in Al-Batool Teaching hospital for Obstetrics and Gynecology, and Al-Khansaa Teaching hospital for Maternity and Children. 10 samples of pregnant women were collected naturally (Control group), the samples included a piece of placenta tissue, in addition to 5 cm_3 of blood, which was separated into a serum. The samples were kept in freezing at -20C° until use.

Enzyme-linted Immunosorbent Assay (ELISA) test was performed to detect positive samples, then molecular investigation was conducted to confirm the diagnosis of the presence of the parasite in the samples. Polemeras Chain Reaction (PCR) technology after DNA extraction and alignment with the B1 gene, and some of them were confirmed. RT-HRM was used to classify the parasite strains by using the Melting Temprture, through which the genetic convergence and genetics among the parasite strains were determined, through a difference in the sequence of nitrogenous bases in specific locations, which was represented by the presence of genetic mutations. The highest level of genetic convergence was observed between the third and fifth strains by determining the value of the melting temprture and the nature of the genetic mutations. The values of the levels of progesterone hormones and growth hormone were also determined in women infected with the parasite and compared with healthy women.

mRNA extracted and converted to the complementary Deoxyribonucleic acid (cDNA) for detection the Gene Expression of the genes *PLGF, VEGF,* NF_kB in the host, and miRNA was extracted and converted to cDNA for detection the activity of micro RNAs: *miR-146*, *miR-124*, *miR-215* ,*miR-132,*

miR, 199 inside the host body, which were all observed to be affected by the virulence factor of the parasite *ROP16*.

The tests results showed that the infection rate was high in the age group less than 30 years, as it reached 11% in the age group (20-15) years, followed by 7.4% in the age group (30-26) years and finally 5.5% in the age group (25-21) years. The results of the nucleotide sequence of the DNA of the positive samples in the molecular investigation also showed the registration of an isolate of the parasite with a genotype of Type I in the city of Mosul within the World Gene Bank at the National Center for Biotechnology Information National Center Biotechnology Information (NCBI) and given the identhfhcation number PP723076.1.

The results of the current study showed a decrease in the level of progesterone hormone in women infected with the parasite (4.75- 2.75 pg/ml) compared to healthy pregnant women, which was high (387.0-232.8 pg/ml). As for Growth hormone levels in women infected with the parasite reached (0.20-10.12 pg/ml) and in healthy pregnant women (0.54-0.11 pg/ml). It was also shown that there was an increase in the gene expression of the virulence factor *ROP16*, which is produced by the parasite Type I compared to the virulence factor *GRA15*. It was shown that the increase in the activity of the gene responsible for the virulence factor *ROP16* increases its production by T.gondii, which works to reorganize the epigenetic and genetic inheritance of the placenta. The increase in this gene led to an effect on certain genes inside the body of women infected with the parasite, including its effect on the transcription factor NF_KB, as its expression in women infected with the parasite (0.13-0.11) while in pregnant women (3.5-3.1) as well as its effect on the gene that stimulates the formation of blood vessels in the placenta Vascular Endothelyad Growth Factor (*VEGF*), as the affected gene decreased in infected women (0.97-0.85) compared to pregnant women(2.44- 1.81), while the results of the current study showed a difference in the activity of the gene responsible for placental growth

compared to pregnant women Placental Growth Factor (*PLGF*) as it reached in women infected with the parasite (0.94 -0.57) compared to pregnant women(7.01-5.86).

The results showed the effect of *ROP16* on microRNAs, as an increase in the expression of *miR-146* was observed in women infected with the parasite (131-1.23) compared with pregnant women (1.07-1.06), and an increase in the expression of *miR-124* in women infected with the parasite (1.43 - 1.33) compared with pregnant women (0.43-0.38), and the expression of *miR-199* also increased in infected women (2.30-2.20) compared with pregnant women (0.65-0.64), and the expression of *miR-132* increased in infected women (1.75 -154) compared with aborted women (0.55-0.50), and finally an increase in the expression of *miR-215* was observed in women with the parasite (1.76-1.62) compared to those who had aborted (0.90-0.95).

The Republic of Iraq

Ministry of Higher

Education Scientific

Mosul University/College of Science

Department of biology

Diagnosis of Infection with *Toxoplasma gondii* parasite in abortion and infected women and its role in increase expression for some types of MicroRNAs caused for abortion cases

Fulk Abdulhafef Khattab Omer

Ph.D. Dissertation

Biology /Zoology

Supervised by

Assistant Prof. **Assistant Prof.**

Najah S. Nayef **Saad G. Salih**

2024 A.D. **1446 A.H.**