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

Evaluation of Sirtuin-3 level and some biochemical parameters in people with Parkinson's disease and study the effect of the leucaena plant on male mice induced with Parkinson's disease

Noor Abdulsatar Majeed Al-Mzori

M.Sc. Thesis in

Chemistry / Biochemistry

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Mohammed Bahry Hassin Al-Sadoon

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

Summary

Our study included three parts:

Part one: human study: an estimate of the level of Sirtuin 3 (SIRT3) and estimated 16 biochemical variables in the serum of Parkinson's patients. These variables included antioxidants (albumin, total bilirubin (TB), ceruloplasmin (Cp), vitamin C, uric acid (UA), and glutathione (GSH)), lipid profile (total cholesterol [TC], low-density lipoprotein cholesterol [LDL-C], triglycerides [TG], high-density lipoprotein cholesterol [HDL-C], very low-density lipoprotein cholesterol [VLDL-C]), mineral elements (iron (Fe), zinc (Zn), and copper (Cu)), glucose, and malondialdehyde (MDA). Natural compounds isolated from Leucaena leucocephala plants were also studied and analyzed. The effects of these compounds in mice with Parkinson's disease (PD) were investigated, and they showed a clear impact on the disease state. The study was conducted on (100) patients and healthy individuals of both genders, ranging in age from (30-80). The impact of gender, age, smoking, and blood group on Parkinson's patients was studied. The results showed a significant decrease ($P \leq 0.05$) in the levels of SIRT3 and lipid profile levels (LDL-C, HDL-C, TG, and TC), as well as antioxidants (TB, UA, albumin, Cp, vitamin C, GSH, and iron), in addition to zinc in the blood serum of patients with Parkinson's disease compared to healthy individuals. The results also indicated a significant increase in glucose, MDA, and Cupper levels among patients with PD compared to healthy individuals. There was a significant decrease in SIRT3 levels among female patients and controls compared to males and a significant increase ($P \leq 0.05$) in MDA, vitamin C, GSH, TG, TC, and LDL-C levels among female patients and controls. The results indicated that albumin, TB, and Cp show non-significant differences between males and females with Parkinson's disease. Likewise, the two groups showed non-significant differences in UA, glucose, HDL-C, VLDL-C, Zn, Cu, and Fe levels. As for the study of the impact of age, the results revealed a decrease in antioxidant levels with advancing age, as well

as lower SIRT3 levels in the patient group compared to the control group. These concentrations were decreased in the patient group with advancing age.

Moreover, the patient group's lipid profile and Zinc levels decreased with age. In contrast, MDA, Cupper, and glucose levels increased ($P \leq 0.05$) in the patient group with advancing age compared with healthy individuals. The results also demonstrated a clear effect of smoking on Parkinson's patients. The levels of SIRT3, antioxidants, and HDL-C decreased in smokers and the control group compared to non-smoker patients and the control group, respectively. The results showed a significant increase in glucose, Cupper, LDL-C, TG, and TC levels at a probability level ($P \leq 0.05$) in smokers and the control group compared to non-smokers and the control group. In terms of blood groups, a clear effect was observed, with the highest rate of PD in blood group A+, followed by B+, AB+, and O+ in successive proportions.

Part two, plant study: This study involved the extraction of natural compounds from the Leucaena plant, including (oils, flavonoids, and alkaloids) using a Soxhlet device. Various solvents were employed in the extraction process with the Soxhlet apparatus. The oils were analyzed using Gas Chromatography (GC), while the flavonoids were analyzed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that the Leucaena plant oils contained a range of fatty acid compounds, including (oleic, palmitic, linoleic, butyric, linolenic, stearic, nervonic, cis-docosadienoic, tricosanoic, myristic, erucic, and arachidic acids). The isolated flavonoids were also identified as (acid, rosemary acid, resveratrol, ferulic acid, and naringenin).

Part three, animal study: This study examined the effects of different doses of natural extracts from the Leucaena plant on male adult mice with PD induced by rotenone. A total of 25 male mice were divided into five groups, each consisting of five mice. The control group (Group 1) remained untreated. Groups 2, 3, 4, and 5 received rotenone injections via intraperitoneal injection (IP) every 48 hours for 21 days at a dose of 2.5 mg/kg of the body weight. In addition, mice in Group 3 were administered an isolated oil extract from the Leucaena plant. They

received a daily intraperitoneal injection of 0.94 mg/kg of body weight for three weeks. Group 4 received a daily intraperitoneal injection of a flavonoid extract at a dose of 49.45 mg/kg of body weight for 21 days. Lastly, mice in Group 5 were given a daily intraperitoneal injection of an alkaloid extract at a dose of 4.42 mg/kg of body weight for 21 days. The results from the second group demonstrated that the rotenone-induced PD mouse model led to a significant reduction in the concentrations of SIRT3 and GSH in the serum of the affected mice compared with the control group. Additionally, it resulted in a significant increase in the concentrations of MDA, glucose, and interleukin 6 (IL-6) compared to the control group. In the third, fourth, and fifth groups, the results demonstrated that administering isolated natural extracts from the Leucaena plant at different doses relative to body weight significantly decreased the concentrations of MDA, glucose, and IL-6. Moreover, it led to a significant increase in the concentrations of SIRT3 and GSH in the serum of mice affected by rotenone-induced PD compared to those in the control group. These findings confirmed the crucial preventive role of flavonoids and components derived from the Leucaena plant in countering PD.

الخلاصة

تضمنت دراستنا ثلاثة أجزاء شملت:

الجزء الأول: دراسة بشرية: تقدير مستوى السيرتوين ٣ (SIRT3) وتقدير ١٦ متغيراً كيميائياً حيوياً في مصل مرضى باركنسون. وشملت هذه المتغيرات مضادات الأكسدة (الألبومين، البيليروبين الكلي (TB)، السيرولوبلازمين (Cp)، فيتامين C، حمض اليوريك (UA)، والكلوتاثيون (GSH)) وملف الدهون (الكوليسترول الكلي [TC]، كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة [C- (LDL]، والدهون الثلاثية [TG]، وكوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة [HDL-C]، وكوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة جدًا [VLDL-C])، والعناصر المعدنية (الحديد (Fe)، والزنك (Zn)، والنحاسCu)) والكلوكوز والمالونداياالديهايد (MDA). كما تمت دراسة وتحليل المركبات الطبيعية المعزولة من نبات الليوسينا. وتمت دراسة تأثيرات هذه المركبات في الفئران المصابة بمرض باركنسون (PD)، وأظهرت تأثيراً واضحاً على الحالة المرضية. أُجريت الدراسة على (١٠٠) عينة من المرضى والأصحاء من الجنسين، وتراوحت أعمارهم بين (٣٠–٨٠) سنة.

تمت دراسة تأثير الجنس والعمر والتدخين وفصيلة الدم على مرضى باركنسون، وأظهرت النتائج انخفاضا معنويا ($P<0.05$) في مستويات SIRT3 ومستويات الدهون (LDL-C، HDL-C، TG، LDL-C وTC)، وكذلك مضادات الأكسدة (TB، UA، الألبومين، Cp، فيتامين C، GSH، والحديد)، بالإضافة إلى الزنك في مصل الدم لدى مرضى باركنسون مقارنة بالمجموعة الضابطة. أشارت النتائج أيضًا إلى وجود زيادة معنوية في مستويات الكلوكوز والمالونداياالديهايد و النحاس بين مرضى PD مقارنة بالأشخاص الأصحاء. كان هناك انخفاض كبير في مستويات SIRT3 بين المرضى الإناث والمجموعة الضابطة مقارنة بالذكور، فضلا عن زيادة كبيرة ($P\leq0.05$) في مستويات MDA، وفيتامين C، وGSH، TG، TC، LDL-C بين المرضى الإناث والمجموعة الضابطة مقارنة بالذكور. وبينت النتائج أن الألبومين والبيليروبين الكلي والسيرولوبلازمين كانت متقاربة إلى حد ما بين الذكور والإناث المصابين بمرض باركنسون، وكذلك حامض اليوريك والكلوكوز وHDL-C والزنك والنحاس والحديد لم تظهر فروق معنوية يُذكر بينهم. أما بالنسبة لدراسة تأثير العمر، فقد كشفت النتائج عن انخفاض مستويات مضادات الأكسدة مع تقدم العمر، وكذلك انخفاض مستويات SIRT3 في مجموعة المرضى مقارنة بالمجموعة الضابطة حيث انخفضت هذه التراكيز في مجموعة المرضى مع تقدم العمر. علاوة على ذلك، انخفضت مستويات الدهون والزنك في مجموعة المرضى مع تقدم العمر. في المقابل، ارتفعت مستويات MDA والنحاس والكلوكوز ($P\leq0.05$) في مجموعة المرضى مع تقدم العمر مقارنة مع الأشخاص الأصحاء. كما أظهرت النتائج تأثيرا واضحا للتدخين على مرضى باركنسون. انخفضت مستويات SIRT3 ومضادات الأكسدة وHDL-C لدى كل من المدخنين والمجموعة الضابطة مقارنة

بالمرضى غير المدخنين والمجموعة الضابطة، على التوالي. أظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً في مستويات الكلوكوز، النحاس، LDL-C، TG، TC عند مستوى احتمال ($P\leq0.05$) لدى كل من المرضى المدخنين ومجموعة السيطرة مقارنة مع المرضى غير المدخنين ومجموعة السيطرة. ولوحظ تأثير واضح على فصائل الدم في مرضى باركنسون، حيث سجلت أعلى نسبة في فصائل الدم A+، يليها B+، AB+، وO+ بنسب متتالية.

الجزء الثاني الدراسة النباتية: تضمنت هذه الدراسة استخلاص مركبات طبيعية من نبات الليوسينا تشمل (الزيوت والفلافونويدات والقلويدات) باستخدام جهاز السوكسلت. تم استخدام مذيبات مختلفة في عملية الاستخلاص باستخدام جهاز سوكسلت. تم تحليل الزيوت باستخدام كروماتوغرافيا الغاز (GC)، في حين تم تحليل الفلافونويدات باستخدام كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC). أظهرت النتائج أن زيوت نبات الليوسينا تحتوي على مجموعة من مركبات الأحماض الدهنية، منها (الأوليك والبالمتيك و اللينوليك و الزبد و اللينولينيك والحامض الدهني نيرفونيك و السيسدوكوسادينويك و الأراكيديك و تريكوسانويك و الميريستيك و الإيروسيك). كما تم التعرف على مركبات الفلافونويد المعزولة وهي (حمض البنزويك، حمض اكليل الجبل، ريسفيراترول، حمض الفيروليك، نارينجينين).

الجزء الثالث، الدراسة على الحيوانات: تناولت هذه الدراسة تأثير جرعات مختلفة من المستخلصات الطبيعية من نبات الليوسينا على ذكور الفئران البالغة المصابة بمرض باركنسون الناجم عن الروتينون. تم تقسيم ٢٥ فأرًا ذكرًا إلى خمس مجموعات، كل مجموعة تتكون من خمسة فئران. ظلت المجموعة الضابطة (المجموعة ١) دون علاج. تلقت المجموعات ٢ و٣ و٤ و٥ حقن الروتينون عن طريق الحقن داخل الصفاق (IP) كل ٤٨ ساعة لمدة ٢١ يومًا بجرعة ٢.٥ ملغم/كغم من وزن الجسم. بالإضافة إلى ذلك، تم إعطاء الفئران في المجموعة ٣ مستخلص زيت معزول من نبات الليوسينا. تلقوا حقنة يومية داخل الصفاق قدرها ٠.٩٤ ملغم / كغم من وزن الجسم لمدة ثلاثة أسابيع. تلقت المجموعة ٤ حقنة يومية داخل الصفاق من مستخلص الفلافونويد بجرعة ٤٩.٤٥ ملغم / كغم من وزن الجسم لمدة ٢١ يومًا. وأخيرًا، تم إعطاء الفئران في المجموعة ٥ حقنة يومية داخل الصفاق من مستخلص قلوي بجرعة ٤.٤٢ ملغم / كغم من وزن الجسم لمدة ٢١ يومًا. أظهرت النتائج في المجموعة الثانية أن إصابة الفئران بمرض باركنسون باستخدام مادة الروتينون أدت إلى انخفاض معنوي في تراكيز SIRT3 والكلوتاثايون في مصل الدم للفئران المصابة مقارنة بمجموعة السيطرة. كما أدت إلى زيادة معنوية في تراكيز المالونداياليديهايد والكلوكوز والانترلوكين-٦ بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. أما في المجموعات الثالثة والرابعة والخامسة، فقد أظهرت النتائج أن استخدام النواتج الطبيعية المعزولة من نبات الليوسينا بجرعات مختلفة نسبيًا لوزن الجسم أدى إلى انخفاض معنوي في تراكيز المالونداياليديهايد والجلوكوز والانترلوكين-٦، وزيادة معنوية في تراكيز SIRT3 والكلوتاثايون في مصل الدم للفئران المصابة بمرض باركنسون الناجم عن الروتينون مقارنة بمجموعة السيطرة. هذه النتائج تؤكد الدور الوقائي المهم للفلافونويد ومكونات نبات الليوسينا ضد مرض باركنسون.

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

تقييم مستوى السيرتوين-3 وبعض المتغيرات الكيموحيوية لدى الأشخاص المصابين بمرض باركنسون ودراسة تأثير نبات الليوسينا على ذكور الفئران المستحثين بمرض باركنسون

نور عبد الستار مجيد محمد أمين المزوري

رسالة ماجستير
علوم الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف
الأستاذ المساعد
الدكتور محمد بحري حسن السعدون