University of Mosul

College of Education

for pure Science

Impact of Vitamin D_3, IL-39 and IL-40 on SLE Disease Severity among Female patients in Baghdad-Iraq

Ahmed Adel shafi Efan

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Hasan Faisal Hussein Kahya

2026 A.D **1447 A.H**

Summary

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic and heterogeneous autoimmune disease characterized by immune dysregulation, overproduction of autoantibodies, and systemic multi-organ inflammation, predominantly affecting women. This study aimed to evaluate hematological, inflammatory, and physiological indices, to investigate the status of vitamin D and its pathway components including vitamin D, vitamin D receptor (VDR), and vitamin D binding protein (VDBP), and to study Toll-like receptor 7 (TLR7) at both gene and protein levels, in addition to measuring the novel cytokines Interleukin-39 (IL-39) and Interleukin-40 (IL-40) in patients with SLE. A case–control study was conducted involving 90 Iraqi female participants, divided into 70 clinically confirmed SLE patients and 20 age-matched healthy controls. Samples were collected from Baghdad Teaching Hospital/Medical City – Baghdad, Iraq. No significant differences in age were observed between the groups (37.68 ± 11.19 vs 36.25 ± 12.42 years; p value = 0.6).

Hematological results showed a significant decrease in white blood cell count in patients compared to controls (7.0 ± 2.33 vs 8.4 ± 2.29 $\times 10^3/\mu L$, p value = 0.01). Monocyte percentage was significantly elevated in patients (7.3 ± 2.23% vs 5.5 ± 0.66%, p value = 0.001), while basophil percentage was reduced (0.4 ± 0.10% vs 0.9 ± 0.27%; p value = 0.001). Inflammatory markers were significantly increased, including C-reactive protein (CRP: 8.04 ± 3.37 vs 1.0 ± 0.96 mg/L, p value = 0.007) and erythrocyte sedimentation rate (ESR: 31.9 ± 13.24 vs 10.6 ± 3.30 mm/hr; p value = 0.001). For vitamin D, no significant difference was observed in

serum 25-hydroxy vitamin D levels between groups (38.9 ± 10.01 vs 40.8 ± 11.45 ng/mL; p value = 0.4).

Serologically, antinuclear antibody (ANA) positivity was significantly higher in patients (p = 0.001), and anti-dsDNA levels were also significantly elevated (36.3 ± 10.81 vs 21.1 ± 7.97, p value = 0.005), with moderate diagnostic performance for anti-dsDNA (ROC AUC = 0.737, cutoff = 21.625, sensitivity = 72%, specificity = 75%). The ROC curve for ANA showed perfect diagnostic performance (AUC = 1.000, cutoff = 10.1350, sensitivity = 100%, specificity = 100%). For the novel cytokines, serum IL-39 and IL-40 levels did not differ significantly between patients and controls (p value = 0.2 and p value = 0.3). TLR7 protein measured by ELISA also showed no significant difference between patients and controls (3.5 ± 1.07 vs 3.9 ± 1.00, p value = 0.2).

At the molecular level, TLR7 gene expression measured by RT-qPCR was significantly upregulated in patients (Mean Ct: 19.286 vs 22.796), corresponding to a 3.5-fold increase (p value = 0.001), with high diagnostic accuracy (ROC AUC = 0.885, sensitivity = 80%, specificity = 95%). Gene expression of both VDR and VDBP showed vitamin D–dependent regulation, with VDR downregulated in vitamin D–deficient patients (Fold change = 0.49, p value < 0.01) and upregulated in patients with sufficient levels (Fold change = 2.15, p value < 0.01), while VDBP was markedly reduced in the vitamin D–deficient group (Fold = 0.20) and increased in the high-level group (Fold change = 1.89, p value = 0.001).

Correlation analysis revealed significant positive relationships between TLR7 gene expression and IL-39 (r = 0.414, p < 0.01), IL-40 (r = 0.554, p < 0.01), and ANA levels (r = 0.416, p = 0.002), in addition to a positive correlation between IL-39 and IL-40 (r = 0.432, p < 0.001). Pearson analysis also showed a positive correlation between patient age

and ANA levels. These data confirm that the integration of molecular (TLR7, VDR, VDBP), serological (ANA, Anti-dsDNA), and cytokine (IL-39, IL-40) markers provides a deeper mechanistic understanding of the disease and forms the basis for developing diagnostic and predictive markers that may contribute in the future to guiding individualized treatment strategies for SLE patients.

الملخص

الذئبة الحمامية الجهازية (SLE) مرض مناعي ذاتي مزمن ومتغاير، يتميز باضطراب المناعة، وفرط إنتاج الأجسام المضادة الذاتية، والتهاب جهازي متعدد الأعضاء، ويصيب النساء بشكل رئيسي. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم المؤشرات الدموية والالتهابية والفسيولوجية، ودراسة حالة فيتامين د ومكونات مساره، بما في ذلك فيتامين د، ومستقبل فيتامين د (VDR)، وبروتين ربط فيتامين د (VDBP)، ودراسة مستقبل تول-7 (TLR7) على المستويين الجيني والبروتيني، بالإضافة إلى قياس السيتوكينات الحديثة إنترلوكين-39 (IL-39) وإنترلوكين-40 (IL-40) لدى مرضى الذئبة الحمامية الجهازية. أُجريت دراسة حالة-شاهد شملت 90 مشاركة عراقية، قُسّمن إلى 70 مريضة تم تشخيص إصابتهن بالذئبة الحمامية الجهازية سريريًا، و20 امرأة سليمة من نفس الفئة العمرية كمجموعة ضابطة. جُمعت العينات من مستشفى بغداد التعليمي/مدينة الطب – بغداد، العراق. لم تُلاحظ فروقٌ ذات دلالة إحصائية في العمر بين المجموعتين (37.68 ± 11.19 مقابل 36.25 ± 12.42 سنة، $p = 0.6$).

أظهرت نتائج فحوصات الدم انخفاضًا ملحوظًا في عدد خلايا الدم البيضاء لدى المرضى مقارنةً بالمجموعة الضابطة (7.0 ± 2.33 مقابل 8.4 ± 2.29 × 10^3/ميكرولتر، $p = 0.01$). كما لوحظ ارتفاعٌ ملحوظ في نسبة الخلايا الوحيدة لدى المرضى (7.3 ± 2.23% مقابل 5.5 ± 0.66%، $p = 0.001$)، بينما انخفضت نسبة الخلايا القاعدية (0.4 ± 0.10% مقابل 0.9 ± 0.27%، $p = 0.001$). ارتفعت مؤشرات الالتهاب بشكل ملحوظ، بما في ذلك البروتين المتفاعل C (CRP: 8.04 ± 3.37 مقابل 1.0 ± 0.96 ملغم/لتر $p = 0.007$) وسرعة ترسب الكريات الحمراء (ESR 31.9 ± 13.24 مقابل 10.6 ± 3.30 مم/ساعة، $p = 0.001$). أما بالنسبة لفيتامين د، فلم يُلاحظ فرقٌ ذو دلالة إحصائية في مستويات 25-هيدروكسي فيتامين د في مصل الدم بين المجموعتين (38.9 ± 10.01 مقابل 40.8 ± 11.45 نانوغرام/مل، $p = 0.4$).

من الناحية المصلية، كانت نسبة إيجابية الأجسام المضادة للنواة (ANA) أعلى بشكل ملحوظ لدى المرضى ($p = 0.001$)، كما كانت مستويات الأجسام المضادة للحمض النووي ثنائي السلسلة (anti-dsDNA) مرتفعة بشكل ملحوظ أيضًا (36.3 ± 10.81 مقابل 21.1 ± 7.97، $p = 0.005$)، مع أداء تشخيصي متوسط للأجسام المضادة للحمض النووي ثنائي السلسلة (مساحة تحت منحنى ROC = 0.737، قيمة القطع = 21.625، الحساسية = 72%، الخصوصية = 75%). أظهر منحنى ROC للأجسام المضادة للنواة أداءً تشخيصيًا ممتازًا (مساحة تحت المنحنى = 1.000، قيمة القطع = 10.1350، الحساسية = 100%،

الخصوصية = 100%). بالنسبة للسيتوكينات الحديثة، لم تختلف مستويات IL-39 و IL-40 في المصل بشكل ملحوظ بين المرضى والمجموعات الضابطة (قيمة p = 0.2 وقيمة p = 0.3). أظهر قياس بروتين TLR7 باستخدام تقنية ELISA عدم وجود فرق يُعتد به إحصائيًا بين المرضى والأصحاء (3.5 ± 1.07 مقابل 3.9 ± 1.00، قيمة p = 0.2).

على المستوى الجزيئي، لوحظ ارتفاع ملحوظ في التعبير الجيني لـTLR7 ، المقاس بتقنية RT-qPCR، لدى المرضى (متوسط قيمة Ct: 19.286 مقابل 22.796)، أي بزيادة قدرها 3.5 أضعاف قيمة(p = 0.001)، مع دقة تشخيصية عالية (مساحة تحت منحنى ROC = 0.885 ، الحساسية = 80%، الخصوصية = 95%) أظهر التعبير الجيني لكل من مستقبل فيتامين د (VDR) وبروتين ربط فيتامين د (VDBP) تعبيراً يعتمد على حالة فيتامين د، حيث انخفض مستوى VDR لدى المرضى الذين يعانون من نقص فيتامين د (القيمة النسبية = 0.49، قيمة p < 0.01) وارتفع لدى المرضى ذوي المستويات الكافية (القيمة النسبية = 2.15، قيمة p < 0.01)، بينما انخفض مستوى VDBP بشكل ملحوظ في مجموعة نقص فيتامين د (القيمة النسبية = 0.20) وارتفع في المجموعة ذات المستويات العالية (القيمة النسبية = 1.89، قيمة p = 0.001).

أظهر تحليل الارتباط وجود علاقات إيجابية معنوية قوية بين التعبير الجيني لـ TLR7 ومستويات IL-39 ($r = 0.414, p < 0.01$) و IL-40 ($r = 0.554, p < 0.01$) و ANA ($r = 0.416, p < 0.002$) بالإضافة إلى ارتباط إيجابي معنوي بين IL-39 ($r = 0.432, p < 0.001$) كما أظهر تحليل بيرسون ارتباطًا إيجابيًا بين عمر المريض ومستويات ANA. تؤكد هذه المعطيات أن دمج المؤشرات الجزيئية (TLR7، VDR، VDBP) والمصلية (ANA، Anti-dsDNA) والسيتوكينات (IL-39، IL-40) يوفّر فهمًا آليًا أعمق للمرض، ويمثل أساسًا لوضع مؤشرات تشخيصية وتنبؤية قد تُسهم مستقبلًا في توجيه العلاج الفردي لمرضى الذئبة الحمامية الجهازية.

جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

تأثير فيتامين د3، والإنترلوكين-39، والإنترلوكين-40 على شدة مرض الذئبة الحمامية الجهازية لدى المريضات في بغداد-العراق

أحمد عادل شافي عيفان

رسالة ماجستير

علوم الحياة

باشراف

الاستاذ المساعد

الدكتور حسن فيصل حسين كاهية

١٤٤٧هـ ٢٠٢٦م