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

The Effect of Polymorphisms in the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Isolated from the Blood of Aortic Atherosclerosis Patients and the Evaluation of the Therapeutic Effect of Nanoparticles from *Commiphora myrrh* Plant in Mice with Aortic Atherosclerosis.

Qusay Hazem Yahya Saleh Al – Hakeem

Ph.D. Thesis in
Chemistry Science / Biochemistry

Supervised by

Assist . Professor Dr. Mohammed Bahry Hassin

1445 A.H **2024 A.D**

summary

This study consists of six parts:

The first Part: It focused on the clinical study that conducted on a group of 140 individuals, both males and females with ages between (30 – 73) years. The participants were divided into two groups: (70) patients with atherosclerosis and 70 control subjects. This study assessed the concentration levels of biochemical parameters, including :plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) , Interleukin-6 (IL6), Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α), Glucose (GLU), Albumin (Alb), Malondialdehyde (MDA), Peroxynitrite (PN), Glutathione (GSH), Total Cholesterol(TC), Triglycerides (TG), High density lipoprolien (HDL-C), Low density lipoprolien (LDL-C), Magnesium (Mg), and Zinc (Zn). The results showed significant increases ($p \leq 0.01$) in patients with aortic atherosclerosis for parameters such as (PAI-1, IL-6, TNF-Alpha, GLU, MDA, PN, TC, TG, and LDL-C). Additionally, the results indicated significant decreases in antioxidant levels, including(GSH, ALB, HDL-C, Mg, and Zn) , compared to the control group.

In addition, the effect of sex, age, smoking, and blood group on the measured variables was studied. The results of the effect of sex showed a significant difference in the concentration level of (PAI-1, IL-6, TNF-α, ALB, MDA, and LDL-C) and showed that there were no significant differences in the concentration level of (Mg, Zn, GLU, PN, TG, HDL-C, and GSH) between males and females of aortic atherosclerosis patients.

To study the effect of age, pathological and normal, the cases were divided into three groups: (30-45), (46-60) and (over 60 years old). The data showed a significant difference in the concentration of (IL-6, PAI-1, GLU, MDA, PN, TC, TG and LDL) at probability ($P \leq 0.05$), and the highest value was for the age group (over 60 years) compared to the other groups. The concentration of (TNF-α) decreased in the second and third categories. (ALB, GSH, and HDL-C)

decreased significantly for the three age groups, where the lowest decrease in albumin levels was for the age group older than (60) years.

Furthermore, the study of the influence of smoking on the measured parameters showed that there was no significant difference between smokers and non-smokers for most of the biochemical variables, namely (PAI-1). The results showed a significant difference in the concentration of peroxynitrite among smokers, and glutathione decreased significantly among smokers.

Also, the relation between plasminogen activator inhibitor-1 and parameters was studied in a group patient. As a result of the analysis, there were low significant correlations in the positive direction with the concentration of(IL-6 and TNF-α), Addtionally the results indicated the presence of highly significant correlations ($p \leq 0.01$) in the positive direction amounting to (0.744) with (GLU, MDA, PN, TC, TG, and LDL-C). The results also showed a low significant correlation ($P \leq 0.01$) of (PAI-1) in the negative direction with the concentration of (ALB, GSH, HDL, Mg, and Zn). The results showed the effect of blood group that the majority of patients with aortic atherosclerosis are individuals with blood type O+, followed by A+, B+, and AB+.

The second part: It involved the partial purification of (PAI-1) from the blood serum of aortic atherosclerosis patients and a healthy individual. In fact, we employed several techniques for purification, including ammonium sulfate precipitation, dialysis , ion exchange chromatography, and electrophoresis. Consequently, a distinct band was obtained for the purified protein, with a molecular weight of approximately (65) kDa for the aortic atherosclerosis patient and (55) kDa for the healthy individual.

The third part: It investigated the genetic polymorphisms of (PAI-1) SNP for gene (RS1799889) in aortic atherosclerosis patients. The results revealed three genetic structures for the gene: the normal (4G4G) structure, the

heterozygous (4G5G) structure, and the mutant (5G5G) structure with bundles of (257) bp and (139) bp.

The fourth part: It focused on the separation and identification of various natural products from the myrrh plant. The study involved the isolation of the oily substance and its fatty acids, which were identified using gas chromatography. Flavonoids and alkaloids were also separated and identified using high-performance liquid chromatography (HPLC). The study found that these compounds had a positive effect on reducing PAI-1 concentration and other measured variables.

The fifth part: It included the study of the impact of isolated natural products from the myrrh plant, as well as other biochemical variables in the blood serum of the mice induced with aortic atherosclerosis. The disease was induced by treating the animals with hydrogen peroxide (1%) for three months, confirmed through tissue analysis of the aortic arch and assessing levels of (LDL-C, TNF, IL-6, HDL-C, TC, TG, and Glu) .

The sixth part: It involved the preparation of Liposome Nanoparticles (LNPs) from the natural products obtained from the Myrrh plant. These nanoparticles were characterized using Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM). The therapeutic effect of these nanoparticles loaded with natural products was evaluated in mice with induced aortic atherosclerosis, showing a positive impact based on tissue sections of the experimental animals.

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية ستة اجزاء: -

الجزء الاول: يشمل الدراسة السريرية التي أجريت على مجموعة مكونة من (140) شخصا من الذكور والاناث تراوحت أعمارهم ما بين (30–73) سنة، تم تقسيمهم على النحو التالي (70) عينة لمرضى تصلب الشريان الابهر، و(70) عينة من الاشخاص كمجموعة ضابطة . قُدر مستوى تركيز كل من: مثبط منشط البلازمينوجين -1 (PAI-1)، و انترلوكين -6 (IL-6)، وعامل نخر الورم – الفا (TNF-Alpha) وسكر الكلوكوز(GLU) والالبومين(Alb) والمالوندايالديهايد (MDA) و البيروكسي نتريت (PN) والكلوتاثيون (GSH) والكوليسترول الكلي (TC) والكليسيريدات الثلاثية (TG) وكوليسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة (LDL-C) وكوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة-HDL C، اضافة الى المغنيسيوم(Mg) والزنك (Zn).

بينت النتائج التي تم التوصل إليها وجود زيادة معنوية عند مستوى الاحتمالية ($p \leq 0.01$) لمرضى تصلب الأبهر للمتغيرات: (PAI-1 و IL-6 و TNF- α و GLU و MDA و PN و TC و TG و LDL-C). كما أظهرت النتائج انخفاضًا معنوياً في مستوى مضادات الأكسدة (GSH و ALB و HDL-C و Mg و Zn) مقارنة بمجموعة السيطرة .

فضلا عن ذلك ، تمت دراسة تأثير الجنس، والعمر، والتدخين، وفصيلة الدم على المتغيرات المقاسة. حيث أظهرت نتائج **تأثير الجنس** وجود فرق معنوي في مستوى تركيز (PAI-1 و IL-6 و TNF- α و ALB و MDA و LDL-C). كما اظهرت الدراسة عدم وجود فروق معنوية في تركيز (Mg و Zn و GLU و PN و TG و HDL-C و GSH) بين الذكور والاناث لمرضى تصلب الشرايين الابهري.

دراسة **تأثير العمر** قُسمت الحالات المرضية والطبيعية إلى ثلاث مجاميع عمرية وهي (30- 45) و (46- 60) و (اكبر من 60 سنة). أظهرت النتائج وجود فرق معنوي في تركيز كل من (PAI-1 و IL- 6 و GLU و MDA و PN و TC و TG و LDL)عند مستوى الاحتمالية ($p \leq 0.05$) وكانت اعلى قيمة للفئة العمرية (أكبر من 60 سنة) مقارنة بالفئات الاخرى . وانخفض تركيز (TNF-α) في الفئة العمرية الثانية والثالثة. وانخفض (Alb و HDL–C GSH) ، بشكل معنوي للفئات العمرية الثلاثة ، حيث كان ادنى انخفاض في مستوى الالبومين للفئة العمرية (أكبر من 60 سنة).

دُرس تأثير التدخين على المتغيرات المقاسة واظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين المدخنين وغير المدخنين لأغلب المتغيرات الكيموحيوية وهي (PAI-1 و IL6 و TNF α و GLU و ALB و MDA و TC و TG و HDL-C و LDL-C و Mg). وبينت النتائج وجود فرق معنوي في تركيز البيروكسي نتريت لدى المدخنين ، كما انخفض الكلوتاثايون بشكل معنوي لدى المدخنين.

دُرست العلاقة بين (PAI-1) وبقية المتغيرات المدروسة لمجموعة مرضى تصلب الشرايين الأبهري الإناث والذكور ، وكانت نتائج التحليل وجود ارتباطات واطئة المعنوية بالاتجاه الموجب مع تركيز (IL-6 و TNF-Alpha)، كما أشارت النتائج الى وجود ارتباطات عالية المعنوية ($p \leq 0.01$) بالاتجاه الموجب بلغت(0.744) مع (GLU و MDA و PN و TC و TG و LDL-C). كذلك بينت النتائج وجود ارتباط واطئ المعنوية ($p \leq 0.01$) لـ (PAI-1) بالاتجاه السالب مع تركيز (ALB و GSH و HDL-C و Mg و Zn) .

أظهرت النتائج تأثير فصيلة الدم أن أكثر المرضى المصابين بمرض تصلب الشرايين الأبهري هم الأشخاص من فصيلة الدم + O ثم تليها +A و+ B ،و +AB. وبنسب 44.3% و 27% و17.1% و 11.4% على التوالي.

الجزء الثاني من الدراسة تضمن تنقية جزئية لـ PAI-1 من مصل دم شخص يعاني من تصلب الشريان الابهر وأخر سليم، وقد طبقت تقنيات عدة للتنقية ابتداء من الترسيب بكبريتات الامونيوم ثم الفرز الغشائي فكروماتوغرافيا التبادل الايوني واخيرا الهجرة الكهربائية. كما تم الحصول على حزمة منفردة عند تطبيق الهجرة الكهربائية على البروتين المنقى (للمريض والسليم) من التبادل الأيوني ، وكان بوزن جزيئي تقريبي مقداره (65) كيلو دالتون للشخص المصاب بتصلب الابهر و(55) كيلو دالتون للشخص السليم .

تناول **الجزء الثالث** من الدراسة تأثير تعدد الاشكال الجينية لجين PAI-1 (RS1799889) في مرضى تصلب الشريان الابهر ، اظهرت النتائج وجود ثلاثة تراكيب وراثية للجين هي التركيب الوراثي الطبيعي 4G4G ، و التركيب الوراثي غير متماثل الزيجة 4G5G ، التركيب الوراثي الطافر 5G5G المتمثل بالحزمة (257bp) والحزمة (139bp).

الجزء الرابع من الدراسة تضمن فصل وتشخيص نواتج طبيعية مختلفة من نبات المر، إذ تم فصل المادة الزيتية ، وأحماضها الدهنية التي تم تشخيصها بتطبيق تقنية كروماتوغرافيا الغاز ذو الاعمدة الشعرية (CGC). كذلك فصلت بعض الفلافونويدات والقلويدات وشخصت الفلافونويدات بتطبيق تقنية

كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC)، كما تناول هذا الجزء دراسة تأثير هذه المواد على (PAI-1) وتبين أن لها تأثير ايجابي في خفض تركيز (PAI-1) وبعض المتغيرات الاخرى المقاسة .

اهتم **المحور الخامس** باختبار تأثير المواد الطبيعية المفصولة من نبات المر ومتغيرات كيموحيوية أخرى في مصل دم الفئران المستحدث فيها مرض تصلب الشريان الابهر، وقد استحدث هذا المرض نتيجة لمعاملة الحيوانات ببيروكسيد الهيدروجين (1%) لمدة ثلاثة اشهر وتم التأكد من الاصابة من خلال الدراسة النسيجية للشريان الأبهر ، فضلا عن اختبار مستوى المتغيرات الكيموحيوية ذات العلاقة بالمرض ، منها (LDL-C و TNFو IL-6 و HDL-C وTC و TG و Glu)

تناول **الجزء السادس** من الدراسة تحضير المركبات النانوية (LNPs) Liposome من النواتج الطبيعية وتشخيص تلك المركبات بطريقة Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM). كما دُرس التأثير العلاجي للمركبات النانوية المحمل عليها النواتج الطبيعية المفصولة من نبات المر. اظهرت المركبات النانوية تأثير علاج ايجابي في الفئران المستحدث فيها المرض الذي تبن من خلال المقاطع النسيجية لحيوانات التجارب .

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

تأثير الاشكال المتعددة لجين مثبط منشط البلازمينوجين -1 المعزول من دم مرضى تصلب الشريان الأبهر وتقييم التأثير العلاجي للمركبات النانوية المحضرة من نبات المر *Commiphora myrrh* في الفئران المصابة بتصلب الشريان الابهر

قصي حازم يحيى صالح الحكيم

اطروحة دكتوراه في
الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف
الأستاذ المساعد الدكتور محمد بحري حسن

1445هـ
2024م