وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

التقييم الفسلجي وتعدد الاشكال الوراثية لجيني ايض الهوموسستين MTHFR و CBS لدى مرضى السكري النوع الثاني

أطروحة

مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

لؤي قاسم عبد الحميد الحميري

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2009
ماجستير علم الحيوان / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2012

بإشراف

أ.د. عمار أحمد سلطان القرةغولي **أ.د. زيد محمد مبارك المهداوي**

1443هـ **2022 م**

1.1-المقدمة: Introduction

يعد داء السكري Diabetes mellitus (DM) متلازمة سريرية تتمثل بحصيلة اضطرابات ايضية منها ارتفاع سكر الكلوكوز في الدم Hyperglycaemia مع اضطرابات ايض الكربوهيدرات والبروتينات والدهون، وينتج حدوث داء السكري بسبب تحطم خلايا بيتا الفارزة لهرمون الانسولين في البنكرياس، مما ينتج عنه نقصاً مطلقاً او نسبي في إنتاج الأنسولين (Almawla واخرون، 2018)، اذ يؤثر نقص الأنسولين على عملية الايض الغذائي للكربوهيدرات والبروتينات والدهون مع حدوث اضطرابات كبيرة في كمية الماء وايونات الجسم، وقد يرتبط اضطراب الايض الغذائي الطويل الأمد بالتغيرات الوظيفية والهيكلية في العديد من الأعضاء خاصة نظام الأوعية الدموية، إذ يمثل ارتفاع السكر في الدم عامل خطر مستقل لكل من أمراض الأوعية الدموية الصغيرة والكبيرة التي تؤدي إلى مضاعفات سريرية لمرضى السكري (Tahir، 2018).

نشر الاتحاد الدولي للسكري International Diabetes Federation (IDF) تقرير إلى أن مرض السكري أدى إلى ما يقرب من خمسة ملايين حالة وفاة في عام 2015، وفضلاً على ذلك ، اعدت منظمة الصحة العالمية عام (2015) (WHO) World Health Organization الى أن مرض السكري سيكون السبب الرئيسي السابع للوفاة بحلول عام 2030، ومع وجود 387 مليون شخص مصاب بمرض السكري في جميع أنحاء العالم ، فانه من المتوقع أن يرتفع إلى 592 مليون بحلول عام 2035 (Al-Khaqani واخرون، 2018). ويتزايد إنتشار مرض السكري في جميع انحاء العالم بسبب ارتفاع السكر المزمن المرتبط بمضاعفات عدة منها امراض الأوعية الدموية Vascular Diseasesعلى المدى الطويل نسبيا التي تؤثر على العينين والكلى والاعصاب وكذلك زيادة خطر الأصابة بأمراض القلب والأوعية

الدموية Cardiovascular Diseases، إذ تستند المعايير التشخيصية لمرض السكري إلى عتبات سكر الدم المرتبطة بمرض الأوعية الدموية الدقيقة (Al-Samarrai و O. R. Al Samarrai، 2020).

يصنف السكري سريريا إلى نوعين أساسيين: النوع الاول وهو السكري المعتمد على الانسولين(IDDM) Insulin Dependent Diabetes Mellitus ، اما النوع الثاني فهو السكري غير المعتمد على الانسولين Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM or T2DM)، والـــ (NIDDM) هو النوع الأكثر من الأمراض المزمنة شيوعاً لدى البالغين (Dauod، 2018).

ويتمثل (NIDDM) بحالة مقاومة الأنسولين Insulin Resistant (IR) التي تتميز بفرط سكر الدم Hyperglycemia والالتهاب Inflammation والإجهاد التأكسدي Oxidative stress والعديد من المضاعفات الوعائية ، مثل تصلب الشرايين Atherosclerosis وارتفاع ضغط الدم الرئوي Pulmonary hypertension وأمراض القلب التاجية Coronary heart disease وارتفاع ضغط الدم Hypertension ، وان كل من مقاومة الأنسولين (IR) ، وارتفاع السكر في الدم ، وخلل شحميات الدمDyslipidemia التي ترتبط بمرض السكري (NIDDM)، تعد كلها وسائط تدخل في الخلل الوظيفي البطاني Endothelial dysfunction (Khaleel واخرون، 2018). وهذا الخلل يساهم بارتباط داء السكري نوع الثاني (NIDDM) بزيادة خطر الإصابة بأمراض القلب التاجية بمقدار ضعفين إلى أربعة أضعاف، وأن عوامل الخطر المعتادة لمرض الشريان التاجي تمثل 25–50٪ من زيادة خطر الإصابة بتصلب الشرايين في مرضى السكري، بالإضافة إلى عامل الخطورة الآخر اضطراب شحميات الدم Dyslipidemia الذي يساهم بشكل كبير في زيادة خطر الإصابة

بأمراض الأوعية الدموية الكبيرة Macrovascular disease في مرضى السكري (Zghair واخرون، 2018). ويتجلى اضطراب شحميات الدم في ارتفاع شحوم الدم Hypertriglyceridemia، وزيادة الكوليسترول الكلي Total cholesterol، والبروتين الدهني منخفض الكثافة low-density lipoprotein (LDL) ، وانخفاض البروتين الدهني عالي الكثافة high density lipoprotein (HDL) (Khaleel واخرون، 2018).

في الآونة الاخيرة، ركز الباحثين على التحقيق في عوامل الخطورة الجديدة ومن ضمنها الهوموسيستين Homocysteine (Hcy) ، وهو حمض أميني في الجسم يحتوي على كبريت وينتج عن طريق تحويل الميثيونين، ومؤخرا تم تحديد الارتفاعات العالية منه كعامل خطر غير مستقل لتصلب الشرايين المبكر Early atherosclerotic وأمراض الأوعية الدموية Vascular disease ومرض الانسداد التجلطي Thromboembolic disease. بالإضافة الى ذلك، أُعد الهوموسيستين عامل خطر وعائي غير مستقل مرتبط بمقاومة الأنسولين في داء السكري من النوع 2 وقصور الكلى وارتفاع ضغط الدم والسمنة(Kangabam واخرون، 2013).

اشار الباحثين الى وجود بيانات متناقضة فيما يتعلق بمقاومة الأنسولين وتأيض الأحماض الأمينية / البروتين في مرض السكري من النوع الثاني، من بينها بيانات محتملة بين مقاومة الأنسولين وتغييرات تأيض الهوموسيستين غير المعروفة إلى حد كبير والتي قد ينجم عنها تلف الاوعية الدموية والتي ربما جميعها مرتبطة بتعديلات البروتين بعد الترجمة (Tessari واخرون، 2005).

إن الفسيولوجيا المرضية لفرط الهوموسستين في الدم في داء السكري النوع الثاني لازالت لحد الان غير معروفة، لذا جاءت هذه الدراسة للتحري عن دور الهوموسيستين في داء السكري النوع الثاني.

2.1-اهداف الدراسة: Aims of Study:

هدفت الدراسة الحالية إلى ما يأتي:

1. تقييم مؤشرات البروتينات الدهنية والانسولين ومقاومة الانسولين لدى مرضى السكري النوع الثاني مقارنةَ بمجموعة الاصحاء.
2. تقييم مستويات الفيتامينات الداخلة في مسارات ايض الهوموسيستين لدى مرضى السكري النوع الثاني ومجموعة الاصحاء.
3. التحري عن مستوى الهوموسيستين لدى مرضى السكري النوع الثاني ومجموعة الاصحاء
4. دور فرط تركيز الهوموسيستين مع مؤشرات البروتينات الدهنية والمؤشرات الكيموحيوية لدى مجموعة مرضى السكري النوع الثاني مقارنة بمجموعة الاصحاء.
5. دور فرط تركيز الهوموسيستين مع مؤشرات مستويات الفيتامينات لدى مجموعة مرضى السكري النوع الثاني مقارنة بمجموعة الاصحاء.
6. التحري عن التباين الوراثي لجين CBS و MTHFR جزيئيا والكشف عن الطفرات النقطية لدى مرضى السكري النوع الثاني ومقارنتها مع مجموعة الاصحاء.

7. معرفة اهم التغايرات الوراثية لجينات CBS و MTHFR في تسلسل الاحماض الامينية باستعمال تقنية تعدد الاشكال للنيوكلوتيدة المفردة SNPs لدى مرضى السكري النوع الثاني ومقارنتها مع مجموعة الاحصاء في مجتمع ديالى.

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى تقييم دور الهوموسستين وتحديد تعدد الاشكال الوراثية لجينات ايض الهوموسستين *MTHFR* و*CBS* لدى مرضى السكري النوع الثاني. اشتملت الدراسة الحالية على 70 مريضاً (33 ذكور و37 اناث) من المصابين بمرض السكري النوع الثاني من المراجعين الى المختبرات التخصصية، والعيادات الاستشارية وبمعدل عمر يتراوح (52.94 ± 1.03) في قضاء بعقوبة / محافظة ديالى، تم جمع العينات من الفترة الممتدة من 20 تشرين الأول 2020 ولغاية 20 اذار 2021، بالمقارنة تم اخذ 21 شخص سليم (10 ذكور و11 اناث) بمعدل عمر يتراوح (44.90 ± 1.47) اعتبروا كمجموعة سيطرة للمقارنة مع مجموعة المرضى. شملت الدراسة الحالية اختبارات المؤشرات الفسيولوجية والكيموحيوية من مصل الدم لكلا المجموعتين وتضمنت تقدير مستوى السكر في الدم وتقدير مستوى الانسولين ومقاومه الانسولين ومؤشر إختبار حساسية الانسولين الكمي. بالإضافة إلى ذلك، تقدير تركيز الهوموسيستين ومستويات فيتامين D، فيتامين B9، فيتامين B12، فيتامين B6، علاوة على ذلك تقدير مستويات البروتينات الدهنية بالمصل وتقدير مؤشرات تصلب الشرايين. أما الدراسة الجزيئية فتضمنت تعدد الاشكال الوراثية لجينات *MTHFR* و*CBS* وذلك بتقنية PCR-Specific primer.

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود إرتفاع معنوي ($P\leq0.01$) في مستويات سكر الدم، مستوى الانسولين، مؤشر مقاومة الانسولين و تركيز الهوموسيستين لدى مرضى السكري النوع الثاني مقارنةً بالاصحاء. كما أشارت النتائج إلى وجود انخفاض معنوي ($P\leq0.01$) في مستويات مؤشر اختبار حساسية الانسولين الكمي لدى مرضى السكري النوع الثاني مقارنةً بالاصحاء. كذلك بينت الدراسة الحالية ارتفاع معنوي ($P\leq0.01$) في مستويات الكوليسترول

الكلي، الكليسيريدات الثلاثية، البروتين الدهني منخفض الكثافة والبروتين الدهني منخفض الكثافة جداً لدى مرضى السكري النوع الثاني مقارنةً بالاصحاء. بينما سجل مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة انخفاضا معنوي ($P\leq0.01$) لدى مرضى السكري النوع الثاني مقارنةً بالاصحاء.

كما أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود إرتفاع معنوي ($P\leq0.01$) في قيم معدلات مؤشر البلازما لتصلب الشرايين AIP، مؤشر التصلب في مصل الدم AI، مؤشر الخطورة التاجية في مصل الدم CRI لدى مرضى السكري النوع الثاني مقارنةً بالاصحاء. في حين سجلت النتائج وجود انخفاضاً معنوي $P\leq0.01$ في مستويات الفيتامينات D, B12, B6, B9 لدى مرضى السكري النوع الثاني مقارنةً بالاصحاء.

أما دور خطورة فرط تركيز الهوموسيستين في نتائج الدراسة، فقد إنعكست على نتائج المؤشرات بارتفاع معنوي ($P\leq0.01$) في مستويات سكر الدم، مستوى الانسولين، مؤشر مقاومة الانسولين، تركيز الهوموسيستين، الكوليسترول الكلي، البروتين الدهني منخفض الكثافة، البروتين الدهني منخفض الكثافة جداً، مؤشر البلازما لتصلب الشرايين AIP، مؤشر التصلب في مصل الدم AI، مؤشر الخطورة التاجية في مصل الدم CRI لدى مجموعة السكري فرط الهوموسيستين مقارنة بالاصحاء.

في حين سجلت خطورة فرط تركيز الهوموسيستين بانخفاض معنوي ($P\leq0.01$) في مستويات الكليسيريدات الثلاثية، مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة، مؤشر إختبار حساسية الانسولين الكمي لدى مجموعة السكري فرط الهوموسيستين مقارنة بالاصحاء. كما بينت النتائج إنخفاضاً معنوي ($P\leq0.01$) في مستويات الفيتامينات D, B12, B6, B9 لدى مجموعتي السكري (ذات فرط تركيز الهوموسيستين والهوموسيستين الطبيعية) مقارنةً بالاصحاء.

أما نتائج الدراسة الجزيئية، فقد تم اجراء تحليل التسلسل الجيني للجينات *MTHFR* (الاكسون الرابع) و*CBS* (الاكسون السابع) قيد الدراسة. وأظهرت الدراسة وجود تغاير وراثي عند موقع المتغايرة rs1801133 G>A في جين *MTHFR* لدى مجموعة المرضى السكري النوع الثاني ومجموعة الاصحاء. كما أشارت نتائج الدراسة إن الطراز الوراثي AA واليلهA لجين *MTHFR* عند موقع المتغايرة rs1801133 G>A قد سجل اعلى نسبة عامل خطورة (18.5%) وعدُ كنمط وراثي وبائي للاستعداد للإصابة بمرض السكري النوع الثاني، في حين لوحظ إنخفاض نسبة الطراز الوراثي GG واليلهG (11.4%) لجين *MTHFR* وبهذا عدُ كنمط وراثي وقائي من الإصابة بالمرض.

علاوة على ذلك، أشارت نتائج الدراسة الى وجود تغاير وراثي أخر عند موقع المتغايرة rs1601352057 G>T في جين *CBS* لدى مجموعة المرضى السكري النوع الثاني ومجموعة الاصحاء. وسجلت نتائج الدراسة ان الطراز الوراثي TT واليله T لجين *CBS* عند موقع التغاير rs1601352057 G>T قد سجل أعلى نسبة عامل خطورة (49.4%) وعدُ كنمط وراثي وبائي للاستعداد للإصابة بمرض السكري النوع الثاني، في حين لوحظ انخفاض نسبة (11.4%) الطراز الوراثي GG واليله G لجين *CBS* وبهذا عدُ كنمط وراثي وقائي من الإصابة بالمرض .

على مستوى العلاقة الارتباطية بين الطرز الوراثية لكل من الجينات قيد الدراسة، أظهرت نتائج الدراسة وجود علاقة ارتباط غير معنوية بين الطرز الوراثية لكل من جين *MTHFR* وجين *CBS* واعلى نسبة خطورة (2.40) كانت لتسلسلات ذات الطرز الوراثية لجين *MTHFR* GG/ *CBS* TT. كما بينت نتائج الدراسة وجود علاقة ارتباط غير معنوية بين الطرز الوراثية لكل من جين *MTHFR* وجين *CBS* واعلى نسبة خطورة (2.15 و1.27)

كانت لتسلسلات ذات الطرز الوراثية لجين *MTHFR* AA/ GA مع جين *CBS* ذات الطراز الوراثي GG.

إن إرتفاع الهوموسيستين يعد عامل خطورة للإصابة بأمراض القلب والشرايين لدى مرضى السكري النوع الثاني وذلك لخطورة المستويات المرتفعة منه أعلى بعده مرات من خطورة الحالات المرضية الأخرى كضغط الدم وارتفاع الكولسترول والسمنة، فضلا عن وجود التغايرات الجزيئية ذات الأنماط الأكثر ترددا وخطورة AA/ GA للمتغايرة rs1801133 لجين *MTHFR* أعلى منه في أنماط المتغايرة rs1601352057 لجين *CBS* والتي تشارك في الاستعداد الوراثي والقابلية للإصابة بمرض السكري النوع الثاني.