



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

**دور تعدد الاشكال لجين العامل المثبط لسرطان الدم والتعبير الجيني
لمستقبلاته والبيتا الابيضاضي الاول بيتا والسابع والثلاثون في تطور
مرض السكري من النوع الثاني**

أطروحة

مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة_جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

أسيل أديب أحمد

بكالوريوس علوم حياة_ كلية للعلوم للنبات_ جامعة بغداد 2003-2004

ماجستير علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة_ جامعة ديالى 2018-2019

بأشراف

أ.د. أسماء محمد صالح المهدي

أ.د. عمار احمد سلطان

2023م

1445هـ

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology



Role of Polymorphism of Leukemia Inhibitory Factor gene and gene expression of its Receptor and IL-1 β and IL-37 in development of type 2 Diabetes Mellitus

A thesis

Submitted to the College of Education for Pure Sciences-
University of Diyala

As a partial requirements for obtaining a Ph.D. degree in Biology

By

Assel Adeeb Ahmed

B.Sc. of Biology- College of Science for Women - University of
Baghdad 2003-2004

M.Sc. of Biology-College of Education for Pure Sciences-
University of Diyala 2018-2019

Supervisor

Prof. Dr

Ammar Ahmed Sultan

Prof. Dr

Asmaa M. Salih Almohaidi

1445 AH

2023 AD

1.1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is the most prevalent type of diabetes, constituting up more than 90% of cases worldwide (International Diabetes Federation, 2021). T2DM is a group of metabolic diseases as a result of defective insulin secretion, action, or both. These disorders can have detrimental effects affected by very complex interactions with environmental and genetic factors(Mandal, 2020). T2DM is no longer a modest disease of old age, but a serious cause of morbidity and mortality in young and adult individuals (Magliano *et al.*, 2020). According to the International Diabetes Federation (IDF), a million individuals aged 18 to 99 have diabetes (Cho *et al.*, 2018). T2DM may reduce life expectancy by up to ten years(Einarson *et al.*, 2018).

Therefore, screening by HbA1C can be an efficient way to diagnose the diabetic (Marrano *et al.*, 2023). The probability of frequent polymorphisms that affect the expression of genes from the same or different causal pathways is linked to a higher risk of developing complex types of T2DM. Diabetes has been associated to more than 1240 gene loci in humans (Banerjee and Saxena, 2012). There may be a connection between metabolic syndrome and diabetes due to persistent inflammation in T2DM is linked to innate immune system dysfunction. T2DM, which is characterized by chronic hyperglycemia and a metabolic problem that is pro-inflammatory, may cause patients to have elevated levels of cytokines in their blood, which would suggest that inflammation plays a causal role in the etiology of the disease (Girard and Vandiedonck, 2022). Cytokines are important mediators of immune and inflammatory immune responses (Hamid *et al.*, 2016). LIF at first known as leukemia inhibitory factor. It is an IL-6 family pleiotropic cytokine that is highly expressed in a variety of tissues (Jorgensen and. de la Puente, 2022). LIF binds to a receptor complex

consisting of gp130 and LIFR, both of which are constitutively associated with receptor-associated JAK molecules, particularly JAK1. also induces the expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (Zhang *et al.*, 2021). This inhibits entire signaling cascades by binding to JAK1 and gp130 and causing their ubiquitination and destruction (Kershaw *et al.*, 2013).

Interleukin-1 β (IL-1 β), a pro-inflammatory cytokine that affects essential metabolic functions like insulin secretion and β -cell apoptosis. IL-1 β the most studied member of the IL-1 family due to its function in the mediation of auto-inflammatory disease and soon emerged as a key player in inflammatory process control (Alfadul *et al.*, 2022).

It has been noted that IL-1 β is an important player in β -cell destruction. β -cell macrophages are the main contributors to IL-1 β production. IL-1 β levels, being a potent pro-inflammatory driving cytokine, is kept under strict regulation by IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) (Margaryan *et al.*, 2020).

Interleukin-37(IL-37) is a newly discovered cytokine in the IL-1 family that has been shown to have wide protective benefits against inflammatory disorders, autoimmune diseases, and cancer. Pro-inflammatory stimuli cause immune and non-immune cells to generate the IL-37 precursor. Caspase-1 cleaves and activates IL-37 intracellularly, and its mature form binds to Smad3; this complex translocates into the nucleus where it suppresses cytokine synthesis, consequently reducing inflammation (Abulkhair *et al.*, 2016; Su and Tao, 2021).

Extracellularly, IL-37 form a complex with IL-18Ra and IL-1R8 (previously IL-1R8 or SIGIRR) that transduces anti-inflammatory signals by the suppression of NF- κ B and mitogen activated protein kinase (MAPK)

pathway (The *et al.*, 2023). IL-37 reduces the expression of various pro-inflammatory cytokines in favor of the expression of anti-inflammatory ones during inflammation by regulating macrophage polarization, lipid metabolism, and inflammasome function (Yan *et al.*, 2019; Cavalli *et al.*, 2021). IL-37 not only modulates innate and acquired immunity, but it also improves immunosenescence associated with older. Finally, because it is abnormally expressed in individuals with inflammatory disorders, autoimmune diseases, and cancer, IL-37 may have the capacity to reduce excessive inflammation; hence, it may be employed as a marker for several types of diseases (Su and Tao, 2021).

1.2 Aims of the Study

The current study aims to support the association between the LIF and LIFR genes with Type 2 diabetes mellitus by the following steps:

- Detecting genetic variations in the LIF and LIFR genes
- Evaluating the relationship between the polymorphism of the LIF and LIFR genes and T2DM
- Evaluating the expression of the genes LIF and LIFR
- Evaluating the expression of the genes IL-1B and IL -37

الخلاصة

داء السكري من النوع الثاني هو مجموعة من الأمراض الأيضية التي تسبب ارتفاع مستويات السكر في الدم نتيجة خلل في إفراز الأنسولين , عمل الأنسولين او كليهما. هذه الاضطرابات يمكن أن يكون لها آثار ضارة . داء السكري من النوع الثاني يتأثر بالعوامل الوراثية والبيئية والالتهابية.

اجريت الدراسة الحالية على 100 مشارك , 60 مريضا (23 ذكور , 37 اناث) كانت مدة تشخيصهم بمرض السكري النوع الثاني سنة واحدة او اقل , و40 شخصا سليما (18 ذكر, 22 اناث) تم اخذهم كمجموعة سيطرة . جمعت العينات من العيادة الاستشارية في قضاء بعقوبة خلال الفترة من كانون الثاني 2022 الى ايلول 2022 . تم تقسيم عينات الدم الوريدي لكل فرد الى ثلاثة اقسام , القسم الاول لاختبارات الكيمياء الحيوية (الهيموكلوبين السكري HbA1C، فصائل الدم) والقسم الثاني لدراسة التغيرات الوراثية اما القسم الثالث لدراسة التعبير الجيني . صممت هذه الدراسة للكشف عن ارتباط تعدد أشكال النوكليوتيدات المفردة (SNP) لعامل مثبت سرطان الدم ومستقبله لدى مرضى السكري النوع الثاني العراقيين باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR). تم إجراء التعبير الكمي للجينات (LIF ، IL-1β ، IL-37 ، LIFR) عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الفعلي (RT-q PCR)، تم إجراء الفحص الجزيئي عن طريق اختيار 30 عينة من المرضى و 30 عينة من السيطرة.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عدد الاناث اكثر من عدد الذكور في مجموعة المرضى وان أعلى فئة عمرية لدى المرضى هي الفئة (40-49 سنة). كما بينت النتائج ارتفاع معنوي ($P \leq 0.01$) في مستوى HbA1C لدى مجموعة المرضى مقارنة بالسيطرة ولم توجد فروق معنوية بين فصائل الدم ومرض السكري النوع الثاني.

تظهر نتائج تسلسل الحمض النووي للمنطقة الاولى من الاكسون الثالث لجين LIF والتي تتكون من 800 زوج قاعدي عن متغايرة واحدة (rs3761427). كشفت المتغايرة rs3761427 ان الانماط الجينية CG و GG والليل G اعلى ترددا بين مجموعة المرضى وقد ترتبط بخطر الاصابة بالمرض . اما المنطقة الثانية من الاكسون الثالث لجين LIF والتي تتكون من 828 زوج قاعدي فقد تم الكشف عن متغايرتين هما (rs1317298693 و rs2267153) . اذ كشفت المتغايرة rs1317298693 ان الانماط الجينية AA و AG والليل A اكثر ترددا في مجموعة المرضى ، يشير ذلك ان الانماط الجينية AA و AG والليل A تعمل كمسبب للمرض. وان النمط الجيني GG للمتغايرة rs2267153 له ارتباط كبير بمرض السكري النوع الثاني ويمكن اعتبار الليل G عامل مسبب للمرض . كما بينت نتائج منطقة الاكسون الاول من جين LIFR والذي يتكون من 740 زوج قاعدي والتي خضعت لتسلسل الحمض النووي للكشف عن المتغايرتين (rs 1561233086 و rs114600569). أذ اظهرت المتغايرة rs

1561233086 ان النمط الجيني AA و CC والليل C اكثر تردد في مجموعة المرضى وقد ترتبط بقابلية الإصابة بمرض السكري النوع الثاني . وكشفت المتغايرة rs114600569 ان النمط الجيني AA والليل A له تردد اعلى في مجموعة المرضى مما يشير الى قابلية الارتباط بالمرض. أظهرت نتائج منطقة الاكسون الثاني لجين LIFR والذي يتكون من 684 زوج فاعدي، وجود ثلاث متغيرات في هذه المنطقة ، متغايرة واحدة مسجلة rs2112586491 وهناك متغيرتين غير مسجلة في الموقع الجيني (3853517) و(38535140). كشفت المتغايرة rs2112586491 ان النمط الجيني AA اعلى بشكل ملحوظ في مجموعة السيطرة مقارنة بمجموعة المرضى . ذلك يشير الى ان النمط الوراثي AA يعمل كعامل وقائي اما النمط الوراثي AC غير متوفر في مجموعة السيطرة . كشف SNP غير المسجل في الموقع الجيني (3853517) ان النمط الجيني CT له ارتباط كبير بالمرض ويمكن اعتبار الليل T عامل مسبب للمرض. و كشف SNP غير المسجل في الموقع الجيني (38535140) ان الانماط الجينية AA و AT لها ارتباط كبير بمرض السكري النوع الثاني والليل A يعتبر كعامل مسبب للمرض. ، تم تسجيل هذا الموقع ضمن NCBI كتسجيل SNPs جديد لأول مرة في مجتمع الدراسة العراقي

تم حساب تعبير جين LIF ، وكانت النتائج (1.91 للمرضى و 1 لمجموعة السيطرة). وكان التعبير الجيني لجين LIFR (1.51 لمجموعة المرضى و 1 للسيطرة). كما بين تعبير IL-1B (2.83 للمرضى و 1 لمجموعة السيطرة). وكذلك تعبير جين IL-37 كان (1.63 لمجموعة المرضى و 1 لمجموعة السيطرة). تظهر هذه النتائج ان التعبير الجيني اختلف بشكل كبير بين مجموعة المرضى ومجموعة السيطرة .

وقد وجد ارتباط معنوي موجب بين التعبير الجيني لجين LIF و جين LIFR ، والتعبير الجيني لجين IL-1 β و جين IL-37 .