جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بابل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

دراسة بعض الواسمات الجينية والناقلات العصبية لمرضى الاكتئاب الشديد في محافظة بابل.

اطروحة

مقدمة الى مجلس كلية العلوم/ جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه فلسفة

في العلوم/ علوم الحياة

من قبل

وسام عبد الامير راضي جودة

(بكالوريوس علوم حياة/ 2002 جامعة بابل)

(ماجستير علوم حياة / تقانة أحيائية/2018 جامعة بابل)

اشراف

أ. د. علي حمود السعدي
جامعة بابل /كلية العلوم

أ. د. كريم ناصر حسين
جامعة بابل /كلية طب حمورابي

2022 م

1444 هـ

2018

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and scientific Research
University of Babylon
College of Science
Department of Biology

Study of some Genetic and Neurotransmitter Markers among Patients with Major Depressive Episode in Babylon Province

A Dissertation

Submitted to the council of College of Sciences at University of Babylon in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctorate of philosophy in Biology

By

Wisam Abed Al-Amer Rady Judaa

(B.Sc. Biology 2002-University of Babylon)

(M.Sc. Biology/ Biotechnology 2018- University of Babylon)

Supervised by

Prof. Dr. Ali Hmood Al-Saadi **Prof. Dr. Kareem Nasir Hussein**

2022 A.D **1444 A.H**

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَأَنْزَلَ اللَّهُ عَلَيْكَ الْكِتَابَ وَالْحِكْمَةَ وَعَلَّمَكَ مَالَمْ تَكُنْ تَعْلَمُ وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة النساء – آية ١١٣

Dedications

To the human teacher Prophet of mercy Mohammed and his household

To my father and mother....

without them, I wouldn't be here today, and I learned perseverance and a love of life from them , God's mercy.

To passion and love.... My brothers and sisters

To my husband, the supporter through hardships who gave his time and effort without hesitation to assist me.

To my hope in this live, my sons.... Faisal and Ameer and to my eyes, my daughter.... Ruqia

To everyone who taught me a letter.. or supported me, even with a smile.

I dedicate this work

Wisam``

الخلاصة

الاضطراب الاكتئابي الشديد، المعروف عموما بالاكتئاب، هو مرض متعدد العوامل ينتج عن تفاعل العوامل الاجتماعية والنفسية والبايلوجية. يتميز بالتعاسة المستمرة، قلة الاهتمام أو المتعة، أنخفاض الطاقة، سوء الاكل والنوم، أعاقة للأنشطة اليومية والوظائف النفسية والاجتماعية وحتى التفكير في الانتحار.

هدفت هذه الدراسة الى الكشف عن العلاقة المحتملة لتعدد الاشكال للجينات المرشحة: جين ناقل النورابنفرين (*NET*)، وجين الناقل الاول للدوبامين (*DAT1*), وجين المستقبل المسكاريني M2 للأستايل كولين(*CHRM2*) وجين المستقبل الثاني 2A للسيروتونين (*5-HT2AR*), وعلاقتها بمستويات النواقل العصبية في الدم مثل النورابنفرين (NE)، والدوبامين (DA)، والاستايل كولين(ACH) والسيروتونين (5-HT)، في مرضى الاكتئاب الشديد.

أجريت هذه الدراسة في الفترة من كانون الثاني عام 2021 الى اب 2021 , في مستشفى الامام الصادق/ مركز الامراض النفسية في محافظة بابل ومختبر DNA في كلية العلوم/ قسم علوم الحياة. تضمنت الدراسة 70 مريضا من المصابين بالاكتئاب الشديد و20 من الأشخاص الاصحاء ظاهريا كمجموعة سيطرة. قسمت العينات الى ثلاث مجموعات وفقا للعمر، فالمجموعة الاولى (30 سنة او اقل) وعددها 26, والمجموعة الثانية (31-45) وعددها 24 والمجموعة الاخيرة (46-65) وعددها 20. كذلك قسمت وفقا للوزن الى أربع مجموعات، فالمجموعة الأولى (اقل من 18) عددها 7, والمجموعة الثانية (18-24.9) وعددها50, والمجموعة الثالثة (25-29.9) وعددها 9 والمجموعة الاخيرة (29.9-39.9) وكان عددها 4.

اشتملت الدراسة الكيموحياتية على قياس مستويات الدوبامين، النورابنفرين، الاستايل كولين والسيروتونين. أما الدراسة الوراثية فشملت استخلاص الحمض النووي من خلايا الدم البيض لمجموعة المرضى والسيطرة. تم تحديد التنميط الوراثي لتعدد الأشكال لـجين *NET* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بتطبيق تقنية نظام التضخيم الحراري للطفرات (ARMS) في حين تم تحديد التغاير الوراثي لجين *DAT1* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام التغير في اعداد التكرارات المترادفة (VNTR).

اما بالنسبة لجين 5-HT2AR وجين *CHRM2*, تم تحديد التنميط الوراثي لتعدد الاشكال بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل وبتطبيق تقنية تعدد الاشكال أحادي السلسلة (SSCP) وتقنية تحديد تسلسل الدنا Sequencing.

أظهرت النتائج انخفاضا معنويا بقيمة ($p\leq 0.05$) في عينات المرضى لمستوى السيروتونين والدوبامين في الذكور، وانخفاضا في مستويات السيروتونين والنورابنفرين في الاناث وبقيمة ($p \leq 0.05, p \leq 0.01$) على التوالي, بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. اما بالنسبة للعمر والوزن فقد أظهرت النتائج انخفاضا معنويا ($p\leq 0.05$) في الدوبامين في الفئة العمرية 30≤ , وفي الدوبامين والنورابنفرين في فئتي الوزن 18> و 25.29.9 .كما انخفض مستوى السيروتونين والدوبامين والنورابنفرين بشكل معنوي ($p\leq 0.05$) مع زيادة مدة المرض , في حين لوحظ ارتفاع في مستوى السيروتونين بشكل معنوي ($p\leq 0.05$) مع زيادة مدة العلاج وانخفاض مستوى الدوبامين والنورابنفرين. في حين لم يكن هناك أي تغير في مستوى الاستايل كولين. كما أظهرت نتائج تحليل الارتباط وجود ارتباط معنوي ايجابي كبير بين مستويات السيروتونين والنورابنفرين($P \leq 0.01$) وبين العمر ومؤشر كتلة الجسم ($P\leq 0.05$).

أظهرت دراسة التنميط الوراثي لجين ناقل النورابنفرين (*NET*) وجود ارتفاع معنوي في تكرار النمط الوراثي CC بنسبة 50٪ ($P \leq 0.01$)عند مقارنته بالنمط الوراثي TT وTCبالنسبة للعينة المرضية ومجموعة السيطرة، في حين لا يوجد فرق معنوي في تكرار النمط الوراثي TT (22,9٪) والنمط الوراثي TC (27,1٪) بين المرضى. أظهرت النتائج وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$)لجين الناقل الاول للدوبامين (*DAT1*) بين التغاير الوراثي V11/11 (64,3٪)والتغاير الوراثيV11/10 (27,1%) فضلا عن وجود فروقات معنوية عالية ($P\leq 0.01$) بين التغاير الوراثي V11/11(64,3٪) والتغاير الوراثي V10/10(8,6%)، في حين لم يكن هناك أي فروق معنوية بين مجموعة المرضى ذات التغاير الوراثي V11/10 (27,1%) ومجموعة المرضى ذات التغاير الوراثي V10/10 (8,6%).

فيما يخص جين المستقبل المسكاريني M2 للأستايل كولين (*CHRM2*)، تشير النتائج الى وجود ارتفاعا معنويا في تكرارالنمط الوراثي CD (27,1%) في المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة ($P \leq 0.05$)، في حين لم يكن هناك أي فرق معنوي بين مجموعة المرضى ذات النمط الوراثي ACD (35,3%) و ABCD (37,1%) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

اما بالنسبة الى جين مستقبل السيروتونين 2A (*5-HT2AR*)، أظهرت النتائج وجود ارتفاعا معنويا في تكرار النمط الوراثي CD (17,1%) في المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة ($P \leq 0.05$)، في حين لم يكن هناك فرق معنوي بين مجموعة المرضى ذات النمط الوراثي BCD (25,7%) وABCD (57,2%) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

أما تسلسل الدنا لجين مستقبل السيروتونين 2A (*5-HT2AR*)، أظهرت نتائج تعدد اشكال النيوكليوتيدات rs6313 C>T وجود ارتفاعا معنويا ($P \leq 0.05$) في تكرار النمط الوراثي CT (76,9%) عند مقارنته بالنمط الوراثي CC (23,1%) بالنسبة للعينة المرضية ومجموعة السيطرة, كما أظهرت نتائج تعدد اشكال النيوكليوتيدات A>G وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$)بين النمط الوراثي AG (84,6%) والنمط الوراثي AA (15,4%) بين المرضى عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

عند دراسة تأثير الأنماط الوراثية لجين ناقل النورابنفرين (*NET*) على مستويات النواقل العصبية، أظهرت النتائج ارتفاعا معنويا ($P \leq 0.05$) في مستوى النورابنفرين والسيروتونين والاستايل كولين بينما لوحظ انخفاضا معنويا ($P \leq 0.05$) في مستوى الدوبامين مع النمط الوراثي CC (50%) مقارنة بالنمط الوراثي TT (22,9) و CT (27,1). اما التغاير الوراثي لجين الناقل الاول للدوبامين (*DAT1*) فقد لوحظ انخفاضا معنويا ($P \leq 0.05$) في مستوى الدوبامين والسيروتونين والنورابنفرين مع التغاير الوراثي V11/11(64,3%) مقارنة بالتغاير الوراثي V11/10 (27,1%) وV10/10(8,6%).

أما جين المستقبل المسكاريني M2 للأستايل كولين (*CHRM2*)، اظهرت النتائج ارتفاعا معنويا ($P \leq 0.05$) في مستوى الاستايل كولين وانخفاضا معنويا ($P \leq 0.05$) في مستوى الدوبامين والسيروتونين والنورابنفرين مع النمط الوراثي CD (27,1%) مقارنة بالنمط الوراثي ACD (35,3%) و ABCD(37,1%) .فيما يتعلق بجين مستقبل السيروتونين 2A (*5-HT2AR*)، كان هناك انخفاضا معنويا ($P \leq 0.05$) في مستوى السيروتونين والدوبامين والنورابنفرين وارتفاعا معنويا في مستوى الاستايل كولين ($P \leq 0.05$) مع النمط الوراثي CD (17,1%) مقارنة بالنمط الوراثي BCD (25,7%) وABCD (57,2%). أما عند دراسة تأثير SNP rs6313 على مستوى النواقل العصبية، لوحظ انخفاضا معنويا ($P \leq 0.05$) في مستوى السيروتونين مع النمط الوراثي CT (76,9%) مقارنة النمط الوراثي CC (23,1%).

أظهرت الدراسة ان النمط الوراثي CC لجين ناقل النورابنفرين (*NET*) والتغاير الوراثي V11/11 لجين الناقل الأول للدوبامين (*DAT1*) وكذلك النمط الوراثي CD لجين المستقبل المسكاريني M2 للأستايل كولين (*CHRM2*) والنمط الوراثي CD و CT لجين مستقبل السيروتونين 2A (*5-HT2AR*) ارتبطت معنويا بحدوث مرض الاكتئاب الشديد بين المرضى العراقيين. كما تبين ان ارتفاع مستوى النورابنفرين مرتبط معنويا بالنمط الوراثي CC,

وانخفاض مستوى الدوبامين مرتبط معنويا بالتغاير الوراثي V11/11, كما أن ارتفاع مستوى الاستايل كولين مرتبط معنويا بالنمط الوراثي CD, وأرتبط انخفاض مستوى السيروتونين معنويا بالنمط الوراثي CD و النمط الوراثي CT.

أظهرت هذه الدراسة ان النمط الوراثي ID لجين *ACE* والنمط الوراثي GG لجين *eNOS* ارتبطت بشكل كبير بحدوث مرض الفشل الكلوي بين المرضى العراقيين كما وجدت الدراسة ان ارتفاع نسبة اليوريا مرتبطة بالنمط الوراثي ID بينما ارتبط ارتفاع مستوى SDMA بالنمط الوراثي GG.

.

Major depressive disorder, generally known as depression, is a multifactorial illness resulting from the interaction of social, psychological, and biological factors. It is marked by persistent unhappiness, lack of interest or pleasure, low energy, worse eating and

sleep, , impeding daily activities and psychosocial functions and even thinking of suicide.

Summary

Major depressive disorder, commonly known as depression, is a multifactorial disease that results from the interaction of social, psychological, and biological factors. It is characterized by persistent unhappiness, lack of interest or pleasure, decreased energy, poor eating and sleeping, impairment of daily activities and psychosocial functions and even ideation of suicide.

This study aimed to reveal the possible relationship of the polymorphisms of the candidate genes: the norepinephrine transporter (*NET*) gene, the dopamine transporter 1 gene (*DAT1*), the M2 muscarinic acetylcholine receptor gene (*CHRM2*) and the serotonin 2A receptor gene (*5-HT2AR*), and their association with the levels of transporters blood neurotransmitters such as norepinephrine (NE), dopamine (DA), acetylcholine (ACH) and serotonin (5-HT), in major depressed patients.

This study was done in a period of January 2021 to August 2021 at the AL- Imam AL-Sadiq Hospital/ Psychiatry Department in Babylon province and DNA research laboratory in University of Babylon /collage of science. The study included 70 patients with major depression and 20 apparently healthy subjects as control group. The samples divided into three subgroups according to age, the first subgroup (≤ 30 years), second subgroup (31-45 years), and third subgroup (46-65). Also, samples divided into four subgroups according BMI, the first subgroup (<18), second subgroup (18-24.9), third subgroup (25-29.9) and the last subgroup (29.9-39.9).

The biochemical study included measuring levels of dopamine, norepinephrine, acetylcholine and serotonin. While the genetic study included DNA extraction from white blood cells for the patient and

control groups. Genotyping of *NET* gene polymorphism was determined by polymerase chain reaction (PCR) applying the amplification refractory mutation system (ARMS) technique, while the genetic variation of *DAT1*gene was determined by PCR using the variable number of tandem repeat (VNTR). As for the *CHRM2* and *5-HT2AR* gene, the genotyping of the polymorphism was determined by PCR applying single-strand conformation polymorphism (SSCP) and DNA sequencing technique.

The results showed significant decrease ($p \leq 0.05$) in serotonin and dopamine levels in males, and a decrease in serotonin and norepinephrine levels in females ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$) respectively, in comparison with the control group. As for the age and BMI, the results showed a significant decrease ($p \leq 0.05$) in dopamine in ≤30 age group, and in dopamine and norepinephrine in >18 and 25.29.9 BMI group. Also, Serotonin, dopamine and norepinephrine were significantly decrease ($p \leq 0.05$) with increasing the duration of MDD, while the level of serotonin was significantly increased ($p \leq 0.05$) with increasing the duration of medication and decrease the level of dopamine and norepinephrine. Whereas, there was no change in the level of acetylcholine. The results of the correlation analysis also revealed a significant positive correlation between the levels of serotonin and norepinephrine ($P \leq 0.01$) as well as between age and BMI ($P \leq 0.05$).

The genotyping study of the *NET* gene showed a significant increase in the recurrence of the CC genotype 50% ($P \leq 0.01$) when compared with the genotype TT and TC for the patients' sample and the control group, while there is no significant difference in the recurrence of the TT genotype (22, 9%) and TC genotype (27,1%) among patients.

The results showed that there were significant differences ($P \leq 0.05$) for *DAT1* gene between the genetic variance V11/11 (64.3%) and V11/10

(27.1%), as well as, high significant differences (P≤0.01) between the genetic variance V11/11 (64.3%) and V10/10 (8.6%), while there were no significant differences between the patients with genetic variance V11/10 (27.1%) and the patients with genetic variance V10/10 (8.6%).

Regarding the *CHRM2* gene, the results indicate a significant increase in the frequency of the CD genotype (27.1%) in patients compared to the control group ($P \leq 0.05$), while there was no significant difference between the group of patients with genotype ACD (35.3%) and (ABCD 37.1%) when compared with the control group.

As for the *5-HT2AR* gene, the results showed a significant increase in the recurrence of the CD genotype (17.1%) in patients compared to the control group ($P \leq 0.05$), whereas, there was no significant difference between the patients group with genotype BCD (25.7%) and ABCD (57.2%) when compared with the control group.

With regards to the DNA sequencing of the 5-HT2AR gene, the results of the rs6313 C>T polymorphism revealed a significant increase ($P \leq 0.05$) in the frequency of CT genotype (76.9%) when compared to CC genotype (23.1%) for the patients' sample and the control group, and the results of A>G polymorphisms showed a significant ($P \leq 0.05$) between the AG genotype (84.6%) and the AA genotype (15.4%) between patients when compared with the control group.

When studying the effect of the genotypes of the *NET* gene on the levels of neurotransmitters, the results showed a significant increase ($P \leq 0.05$) in the level of norepinephrine, serotonin and acetylcholine, while a significant decrease ($P \leq 0.05$) was observed in the level of dopamine with the CC genotype (50%) compared to the TT (22,9) and CT (27,1) genotype. As for the genetic variation of the *DAT1* gene, a significant

decrease ($P \leq 0.05$) was observed in the levels of dopamine, serotonin and norepinephrine with the genetic variance V11/11 (64.3%) compared to the V11/10 (27.1%) and V10/10 (8.6%).

Regarding the *CHRM2*, the results showed a significant increase ($P \leq 0.05$) in the level of acetylcholine and a significant decrease ($P \leq 0.05$) in the level of dopamine, serotonin and norepinephrine with the CD genotype (27.1%) compared to the ACD (35.3%) and ABCD (37.1%) genotype. As for the *5-HT2AR* gene, there was a significant decrease ($P \leq 0.05$) in the level of serotonin, dopamine and norepinephrine and a significant increase in the level of acetylcholine ($P \leq 0.05$) with the CD genotype (17.1%) compared to the BCD (25.7%) and ABCD (57.2%) genotype. When studying the effect of SNP rs6313 on the level of neurotransmitters, a significant decrease ($P \leq 0.05$) was observed in the level of serotonin with the CT (76.9%) genotype compared to the CC (23.1%) genotype.

This study revealed that the CC genotype of *NET* gene and V11/11 genetic variance of *DAT1* gene, as well as the CD genotype of *CHRM2* gene and the CD and CT genotype of *5-HT2AR* gene was significantly associated with the incidence of major depression among iraqi patients. Also, the study found that a high level of norepinephrine was associated with the CC genotype, and a low level of dopamine was associated with the genetic variance V11/11, while the high level of acetylcholine was associated with the CD genotype, and the low level of serotonin was associated with the genotype CD and CT genotype.

Summary

List of Tables

No.	Title	Page
Chapter two		
Table (2-1)	Criteria for diagnosis of Major Depressive Disorder	8
Chapter three		
Table (3-1)	Chemicals and kits that used in the study with its origin	56
Table (3-2)	Instruments used in this study with its supplying company	57
Table (3-3)	Components of DNA Extraction Kit	65
Table (3-4)	Sequences of primers used for PCR- Amplification.	69
Table (3-5)	The program used for *NET* gene amplification	70
Table (3-6)	The program used for *DAT1* gene amplification	70
Table (3-7)	The program used for *CHRM2* gene amplification	71
Table (3-8)	The program used for *5-HT2AR* gene amplification	71
Table (3-9)	The components of SSCP gel	74
Table (3-10)	The main steps of staining of DNA in polyacrylamide gels	76
Chapter Four		
Table (4-1)	Distribution of study population by main demographic features.	79
Table (4-2)	The association of study groups by different variables	80
Table (4-3)	The comparison of parameters (Serotonin, Dopamine, Acetylcholine and Norepinephrine) in both gender between patients and control group	84
Table (4-4)	Mean differences of age and BMI for both genders in depressed patients and control group	87
Table (4-5)	The impact of age groups on biochemical parameters of Depressed patients	88
Table (4-6)	The impact of BMI groups on biochemical parameters of Depressed patients	89
Table (4-7)	The impact of duration of disease on biochemical parameters of Depressed patients	91
Table (4-8)	The impact of duration of medication on biochemical parameters of Depressed patients	92

Table (4-9)	A comparison of parameter (Serotonin, Dopamine, Acetylcholine and Norepinephrine) between treated and untreated of depressed patients.	94
Table (4-10)	Genotype distribution and odd ratio of *NET* gene polymorphism of patient and control groups	100
Table (4-11)	Association of *NET* gene polymorphisms in depressed patients with biochemical parameters	102
Table (4-12)	Genotype distribution and odd ratio of *DAT1 VNTR* polymorphism of patient and control groups	105
Table (4-13)	The effect of *DAT1 VNTR* polymorphisms in some biochemical parameters in Depressed patients group	106
Table (4-14)	The haplotype distribution and odd ratio of *CHRM2*Gene polymorphism of patient and control groups	111
Table (4-15)	Association of *CHRM2* Gene Polymorphisms with Biochemical Parameters in Patients with major depressive disorder	111
Table (4-16)	Single nucleotide polymorphism in the 3 prime untranslated region of *CHRM2* gene, based on information from sequencing	112
Table (4-17)	The haplotype distribution and odd ratio of *5-HT2AR* Gene polymorphism of patient and control groups	119
Table (4-18)	Association of *5-HT2AR* Gene Polymorphisms with Biochemical Parameters in Patients with major depressive disorder	119
Table (4-19)	Types of SNPs in the exon 2 region of the 5-HTR2A gene based on sequencing results	122
Table (4-20)	Genotype and allele frequency of rs6313 SNP at exon 2 region of the 5-HTR2A gene based on sequencing results	124
Table (4-21)	The impact of rs 6313 SNP on biochemical parameters of Depressed patients	125

Table (4-22)	Genotype and allele frequency of SNP rs770043192at exon 2 regions of the 5-HTR2A gene based on sequencing results	125
Table (4-23)	Genotype and allele frequency of SNP G> T 778 at exon 2 region of the 5-HTR2A gene based on sequencing results	126
Table (4-24)	Genotype and allele frequency of SNP G>T 885 at exon 2 region of the 5-HTR2A gene based on sequencing results	127
Table (4-25)	Genotype and allele frequency of SNP A>G 784 at exon 2 region of the 5-HTR2A gene based on sequencing results	128
Table (4-26)	The impact of A>G 784 SNP on biochemical parameters of Depressed patients	128