

Molecular and Biochemical Studies of the Therapeutic Effects of Shark Cartilage on Gene *p53* and Some Blood Parameters in Rats Exposed to Ionizing Radiation with a Special Reference to Tissues Not Directly Exposed to Such Radiation

Thesis
Submitted in Partial Fulfillment for M. Sc.
in Molecular Biology

Presented by:

Reham Ahmad Aboul Fetouh Mahmoud

Supervised by:

Prof. Dr. Monir A. El-ganzuri

Emeritus Prof. of Cell Biology

Zoology Department

Faculty of Science

Ain Shams University

Prof. Dr. Sohier S. Korraa

Professor of Molecular Biology

Radiation Health Research Department

National Centre for Radiation

Research and Technology

Atomic Energy Authority

Dr. Samah Fekry Darwish

Assistant Professor of Molecular Biology

Biotechnology Research Unit

Animal Reproduction Research Institute (ARRI)

2012

I declare that this thesis was fulfilled by me and that it has not been submitted before for a degree at this or any other university.

Reham Ahmad Aboul Fetouh

أشكر الأساتذة الذين قاموا بالإشراف و هم:

. . / منير على الجنزورى
أستاذ متفرغ بيولوجيا الخلية -
قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة عين شمس.

. . / سهير سعد محمد قراعه
أستاذ البيولوجيا الجزيئية -
قسم البحوث الصحية الإشعاعية - المركز القومي لبحوث و تكنولوجيا الإشعاع -
هيئة الطاقة الذرية.

. / سماح فكرى درويش
أستاذ مساعد بيولوجيا جزيئية -
وحدة بحوث التكنولوجيا الحيوية - معهد بحوث التنااسليات الحيوانية.

و كذلك أشكر الهيئات التالية:

- قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة عين شمس.
- قسم البحوث الصحية الإشعاعية - المركز القومي لبحوث و تكنولوجيا الإشعاع -
هيئة الطاقة الذرية.
- وحدة بحوث التكنولوجيا الحيوية - معهد بحوث التنااسليات الحيوانية .
- أكاديمية البحث العلمى و التكنولوجيا.



كلية العلوم

. ريهام أحمد أبو الفتوح :

الدرجة العلمية: ماجستير فى العلوم.

القسم التابع له: علم الحيوان.

:

سنة التسجيل:

:



كلية العلوم

رسالة ماجستير فى العلوم

: ريهام أحمد أبو الفتوح .

: دراسات جزيئية و بيوكيميائية للتأثيرات العلاجية لغضروف القرش
على الجين p53 و بعض المعايير بالدم في الجرذان المعرضة للإشعاع المؤين مع
الأخذ فى الاعتبار أنسجة لم تعرض مباشرة للتشعيع.
الدرجة العلمية: ماجستير فى العلوم.

. . / منير على الجنزورى

أستاذ متفرغ بيولوجيا الخلية -

قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة عين شمس.

. . / سهير سعد قراعه

أستاذ البيولوجيا الجزيئية -

قسم البحوث الصحية الإشعاعية - المركز القومي لبحوث و تكنولوجيا الإشعاع -
هيئة الطاقة الذرية.

. / سماح فكرى درويش

أستاذ مساعد بيولوجيا جزيئية -

وحدة بحوث التكنولوجيا الحيوية - معهد بحوث التناسليات الحيوانية.

الدراسات العليا

: أجزت الرسالة بتاريخ: / /

موافقة مجلس الكلية: / /
:

دراسات جزيئية و بيوكيميائية للتأثيرات العلاجية لغضروف
القرش على الجين $p53$ و بعض المعايير بالدم في الـ
المعرضة للإشعاع المؤين مع الأخذ في الاعتبار أنسجة لم
تعرض مباشرة للتشعيع

:

/ ريهام أحمد أبو الفتوح محمود

كجزء متمم للحصول على درجة الماجستير في العلوم

:

أ. / سهير سعد قراعه
أستاذ البيولوجيا الجزيئية
قسم البحوث الصحية الإشعاعية
المركز القومي لبحوث و تكنولوجيا الإشعاع
هيئة الطاقة الذرية

. / منير على الجنزورى
أستاذ متفرغ بيولوجيا الخلية
قسم علم الحيوان
كلية العلوم
جامعة عين شمس

. / سماح فكرى درويش
أستاذ مساعد بيولوجيا جزيئية
وحدة بحوث التكنولوجيا الحيوية
معهد بحوث التناسليات الحيوانية

ACKNOWLEDGEMENTS

In the name of Allah – most graceful and most merciful – I give thanks first and mainly to Allah who enabled me to accomplish this work and blessed me with my great mentors and amazing family.

Gratitude and full appreciation to **Prof. Dr. Monir Ali El-ganzuri**, Emeritus Professor of Cell Biology, Zoology Department, Faculty of Science, Ain Shams University. Thanks for his valuable advice, continuous encouragement and honorable supervision throughout this thesis. Thanks are also to him for donating the time for the very accurate and thorough reading and revision of the thesis despite his countless obligations.

My deepest heart-felt gratitude and appreciation to **Prof. Dr. Sohier Saad Korraa**, Professor of Molecular Biology, National Centre for Radiation Research and Technology, Atomic Energy Authority. If it were not for her amazing guidance, support and encouragement, this work would have never seen the light. Thanks for her helpful insight, and for suggesting and enriching this topic of work.

I would like to express my sincere gratitude and thanks for **Dr. Samah Fekry Darwish**, Assistant Professor

ACKNOWLEDGEMENT

of Molecular Biology, Biotechnology Research Unit, Animal Reproduction Research Institute for her continuous support. Thanks to her for teaching me numerous skills, answering all my inquiries and sharing all her precious knowledge and experience with me.

I would like to express my sincere gratitude and thanks for the academy of scientific research and technology for providing me with a scholarship in atomic energy authority for achieving my M. SC. degree.

Last but not least, I would like to thank my parents, my sister and anyone who ever helped and encouraged me to complete this thesis. My absolute love, respect and gratitude go to my parents and my sister for providing me with support, encouragement and amazing insights all the time.

CONTENTS

	Page
• LIST OF ABBREVIATIONS.	i
• LIST OF FIGURES.	iii
• LIST OF TABLES.	v
• INTRODUCTION.	1
• AIM OF THE WORK.	6
• REVIEW OF LITERATURE:	7
–Radiation.	7
–Effects of radiation.	8
–Bystander effect.	11
–Effect of radiation on bone marrow.	13
–The <i>p53</i> gene.	14
–Role of the <i>p53</i> gene in oxidative stress and inflammation.	18
–Free radicals and oxidative stress.	19
–Nitric oxide.	21
–Lipid peroxidation.	23
–Plasma protein carbonyls.	24
–Anti-oxidants.	25
–Catalase (CAT).	27
–Shark cartilage (SC).	27
• MATERIALS AND METHODS.	32

CONTENTS

	Page
• RESULTS:	60
(1) Results of Molecular Investigations:	60
(A) DNA extraction, verification and PCR.	60
(B) Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis.	61
(C) RNA extraction, reverse transcription and PCR for the housekeeping gene.	65
(D) PCR amplification of <i>p53</i> mRNA.	66
(2) Results of Biochemical Investigations:	67
(A) Plasma nitrite level.	67
(B) Malondialdehyde (MDA) level in plasma.	69
(C) Plasma protein carbonyls level.	71
(D) Catalase (CAT) activity in plasma.	73
• DISCUSSION.	75
• SUMMARY AND CONCLUSION.	91
• REFERENCES.	96
• ARABIC SUMMARY.	
• ARABIC ABSTRACT.	

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA: analysis of variance.

CAT: catalase.

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid.

CS: chondroitin sulphate.

DNA: deoxyribonucleic acid.

DNPH: 2, 4-dinitrophenylhydrazine.

DSBs: double strand breaks.

EDTA: ethylenediaminetetra-acetic acid

GAG: glycosaminoglycans.

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

GHCl: guanidine hydrochloride.

GSH: reduced glutathione.

Gy: Gray.

LSD: less significant difference.

MDA: malondialdehyde.

mRNA: messenger ribonucleic acid.

NEDD: N-1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride.

NO: nitric oxide.

NO_x: nitrite /nitrate.

LIST OF ABBREVIATIONS

PCR: polymerase chain reaction.

Rb: retinoblastoma.

RNS: reactive nitrogen species.

ROS: reactive oxygen species.

SC: shark cartilage.

SOD: superoxide dismutase.

SPSS: statistical package for social science.

SSCP: single-strand conformation polymorphism.

ssDNA: single-stranded DNA.

TBA: thiobarbituric acid.

TBE: tris borate EDTA buffer.

TCA: trichloroacetic acid.

TEMED: N, N, N', N'-tetramethylethane-1, 2-diamine.

VCl₃: vanadium trichloride.

WBI: whole body irradiation.

LIST OF FIGURES

Fig. No.	Description	Page No.
1	The design of the device used for rats' right femurs irradiation procedure.	35
2	Standard curve of sodium nitrite.	53
3	Standard curve of MDA.	55
4	Verification of DNA extraction on 1.5% agarose gel.	60
5	Verification of amplified PCR product (exons 5 and 6) of gene <i>p53</i> on 1.5% agarose gel. Lane 1: marker and lanes 2-8: PCR products.	61
6	SSCP analysis of <i>p53</i> gene exons 5 and 6 showing normal bands in lanes 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11 and mobile shift bands in lanes 3, 8, 10, 12.	62
7	SSCP analysis of <i>p53</i> gene exons 5 and 6 showing normal bands in lanes 1, 2, 3, 4, 6 and mobile shift bands in lanes 5, 7, 8, 9.	63
8	The frequency of polymorphisms in exons 5 and 6 of the <i>p53</i> gene in bone marrow cells of all the rats' subgroups.	65
9	Verification of amplified PCR product of the housekeeping gene " <i>GAPDH</i> " on 1.5% agarose gel. Lane 1: marker and lanes 2–12: PCR products.	66
10	Verification of amplified PCR product of <i>p53</i> mRNA on 1.5% agarose gel. Lane 1: marker, lane 2: liver specimen, lane 3: brain specimen and lanes 4 and 5: bone marrow specimens PCR products.	67
11	Mean $\pm$ standard deviation of plasma nitrite of all the rats' subgroups.	69

LIST OF FIGURES

Fig. No.	Description	Page No.
12	Mean $\pm$ standard deviation of malondialdehyde (MDA) in the plasma of all the rats' subgroups.	71
13	Mean $\pm$ standard deviation of protein carbonyls in plasma of all the rats' subgroups.	73
14	Mean $\pm$ standard deviation of catalase activity in plasma of all the rats' subgroups.	74

LIST OF TABLES

Table No.	Description	Page No.
1	The frequency of polymorphisms in exons 5 and 6 of the <i>p53</i> gene in bone marrow cells of all the rats' subgroups.	64
2	Mean $\pm$ standard deviation of plasma nitrite of all the rats' subgroups.	68
3	Mean $\pm$ standard deviation of malondialdehyde (MDA) in the plasma of all the rats' subgroups.	70
4	Mean $\pm$ standard deviation of protein carbonyls in plasma of all the rats' subgroups.	72
5	Mean $\pm$ standard deviation of catalase activity in plasma of all the rats' subgroups.	74