University of Mosul

College of Veterinary Medicine

The relationship between heat shock proteins gene expression and some antioxidants enzymes gene expression in bone marrow cells during first three months age in rats

Walaa Alaadin Mustafa

MSc / Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Physiology

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Ali Saeed Hammoodi Al-chalabi

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

Abstract

The importance of bone marrow lies not only in providing the body with different blood cells, but rather in its ability to provide the body with renewable stem cells involved in tissue regeneration or stem cell transplantation as a treatment for many diseases. Bone marrow cells are regulated by many intrinsic factors, the most important of which are heat shock proteins and antioxidant enzymes that work together within a micro-environment to maintain the functioning of these cells during lifestyle. The aim of the study was to look into the relationship between gene expression profiling in healthy rats' bone marrow hematopoietic cells through the study of gene expression of certain heat shock protiens Hsps and antioxidant enzymes, and evaluate the bone marrow cytology within first three months old. A total healthy 90 neonate pups were employed throughout the study, divided into three groups according to study design thirty pups each. Group 1 pups were kept till 1 month old, group 2 pups were kept till two months and the third group were left till three months old. When the rats reached the prescribed age, bone marrow samples were taken after euthanized the animas by physical method of euthanasia via cervical dislocation of unanesthetized animals. Bone marrow samples were collected from the femur and tibia. Bone marrow smears were made and stained with May Grunwald Giemsa stain a MGG stain to evaluate the bone marrow cytology. The samples were collected every 5 samples in an Eppendorf test tube, 6 tubes for each group, and kept in deep freezing at -80°C for studying the gene expression of selected genes. The results of bone marrow smears showed different stages of haematopoiesis including erythroid, myeloid, and megakaryocyte cell lines production. Moreover, the morphological evaluation of haematopoietic cells revealed all different types of progenitors

and immature cells of both erythroid and myeloid cells and their counts were varied with age progress.

Moreover, the gene expression of Hsps and antioxidant enzymes showed constant regulation throughout the study except Hsps90α revealed down-regulation at age 3 months compared to first 2 months; antioxidant enzyme GPX1 expression revealed up-regulation at 2, and 3 months old compare to first month of age. In addition to that the fold change of Hsp90β was exhibited an increase in fold change throughout the study period, while Hsp90α was exhibited increase in fold change at 3 months old. The antioxidants enzymes also were showed increase in their fold change throughout the study period.

The relationship between studied genes revealed direct strong relationship between SOD3 and Hsp90β and strong inverse correlation between GPX1 expression and Hsp90α only. On the other hand, other genes showed mild non-significant correlation. Meanwhile, to look into the relationship between gene expression profiling and healthy bone marrow hematopoietic cells was interesting through their correlation among them with independence manner according to the type of haematopoietic cells and certain genes.

The study concludes that bone marrow cells differentiation and proliferation are related to age progress, haematopoietic cells differentiation and proliferation are regulated by bone marrow microenvironment conditions via Hsps and antioxidant genes. Also, Hsps90α and 90β and antioxidant enzymes CAT, SOD3 and GPX1 are the main genes that regulates the myeloid cell line production and differentiation. Hsps90β and 27 and antioxidant SOD3 are mainly regulates the erythroid cell line production and differentiation and maturation. There is a direct relationship

between Hsp90β and SOD3 and inverse relationship between GPX1 and Hsps90α as noticed. There is no correlation between all antioxidant genes and Hsp27 gene expression during haematopoiesis.

الخلاصة

لا تكمن أهمية نخاع العظام في تزويد الجسم بخلايا الدم المختلفة فحسب، بل تكمن في قدرته على تزويد الجسم بالخلايا الجذعية المتجددة التي تشارك في تجديد الأنسجة أو زرع الخلايا الجذعية كعلاج للعديد من الأمراض. يتم تنظيم خلايا نخاع العظام من خلال العديد من العوامل الجوهرية، وأهمها بروتينات الصدمة الحرارية والإنزيمات المضادة للأكسدة التي تعمل معا داخل بيئة دقيقة للحفاظ على عمل هذه الخلايا أثناء نمط الحياة. كان الهدف من الدراسة هو النظر في العلاقة بين تنميط التعبير الجيني في الخلايا المكونة للدم نخاع العظام للجرذان السوية من خلال دراسة التعبير الجيني لبعض بروتينات الصدمة الحرارية والإنزيمات المضادة للأكسدة، وتقييم الخلايا نخاع العظام في غضون الأشهر الثلاثة الأولى من العمر. تم استخدام تسعين جروا حديثي الولادة خلال فترة الدراسة، مقسمة إلى ثلاث مجموعات وفقا لتصميم الدراسة ثلاثين جروا لكل منهما. مجموعة الأولى تم الاحتفاظ الجراء حتى عمر شهر، المجموعة الثانية تم الاحتفاظ الجراء حتى عمر شهرين وتركت المجموعة الثالثة حتى ثلاثة أشهر من العمر. عندما وصلت الجرذان إلى العمر المحدد، تم أخذ عينات نخاع العظم بعد الموت الرحيم للحيوانات بالطريقة الفيزيائية للقتل الرحيم عن طريق خلع الفقرات العنقية للحيوانات غير المخدرة. تم جمع عينات نخاع العظم من عظم الفخذ والساق. تم عمل مسحات نخاع العظام وصيغها بصبغة May Grunwald-Giemsa لتقييم خلايا نخاع العظم. ثم تم جمع كل 5 عينات في أنبوب اختبار إيبندورف، 6 أنابيب لكل مجموعة، وحفظت في التجميد في −80 درجة مئوية لدراسة التعبير الجيني للجينات المختارة.

أظهرت نتائج مسحات نخاع العظم مراحل مختلفة من تكون الدم بما في ذلك إنتاج خطوط خلايا الكريات الحمر والبيض والخلايا العملاقة المكونة للصفيحات الدموية. علاوة على ذلك، كشف التقييم الشكلي للخلايا المكونة للدم عن جميع الأنواع المختلفة من الأسلاف والخلايا غير الناضجة لكل من خلايا الدم الحمراء والخلايا النخاعية وتنوعت أعدادهم مع تقدم العمر.

وعلاوة على ذلك، أظهر التعبير الجيني لبروتينات الصدمة الحرارية والإنزيمات المضادة للأكسدة التنظيم المستمر في جميع أنحاء الدراسة باستثناء بروتين الصدمة الحرارية 90، حيث كشفت تنظيم واطئ في عمر 3 أشهر مقارنة مع الشهر الأول والثاني، وكشفت التعبير الجيني لمضاد للأكسدة كلوتاثيون بيروكسديز 1 عن التنظيم العالي في الشهرين الأول والثاني من العمر مقارنة مع الشهر الأول من العمر. بالإضافة إلى أن تغيير عدد طيات بروتين الصدمة الحرارية 90 بيتا أظهر زيادة في تغيير عدد طيات البروتين طوال فترة الدراسة، في حين أظهر بروتين الصدمة

الحرارية90 ألفا زيادة مضاعفة في تغيير عدد الطيات في الشهر الثالث من العمر. كما أظهرت إنزيمات مضادات الأكسدة زيادة في تغير عدد الطيات طوال فترة الدراسة.

كشفت العلاقة بين الجينات المدروسة عن علاقة قوية مباشرة بين أنزيم السوبر أوكسيد ديسميوتيز 3 وبروتين الصدمة الحرارية 90 بيتا وارتباط عكسي قوي بين أنزيم الكلوتاثيون بيروكسيديز 1 والتعبير الجيني لبروتين الصدمة الحرارية 90ألفا فقط. في حين أن الجينات الأخرى أظهرت ارتباطا خفيفا غير معنوي. وفي الوقت نفسه، في النظر في العلاقة بين تنميط التعبير الجيني والخلايا المكونة للدم نخاع العظام السليمة كانت مثيرة للاهتمام من خلال ارتباطها فيما بينها بطريقة مستقلة وفقا لنوع من الخلايا المكونة للدم وبعض الجينات.

وخلصت الدراسة إلى أن تمايز خلايا نخاع العظام وانتشارها يرتبطان بالتقدم في العمر، ويتم تنظيم تمايز الخلايا المكونة للدم وانتشارها من خلال ظروف البيئة الدقيقة لنخاع العظام عن طريق جينات بروتينات الصدمة الحرارية وجينات الانزيمات المضادة للأكسدة. أيضا، بروتيني الصدمة الحرارية 90 ألف وبيتا والإنزيمات المضادة للأكسدة الكاتاليز، السوبر أوكسيد ديسميوتيز 3و الكلوتاثيون بيروكسيديز 1 هي الجينات الرئيسية التي تنظم إنتاج وتمايز خط الخلايا النخاعية البيضاء. بروتين الصدمة الحرارية 90 بيتا و27 وأنزيم مضاد الأكسدة السوبر أوكسيد ديسميوتيز هي أساسا لتنظم نضج وتمايز إنتاج خط خلايا الدم الحمراء. وقد لوحظت علاقة مباشرة بين بروتين الصمدة الحرارية 90 بيتا وأنزيم السوبر أوكسيد ديسميوتيز 3 وعلاقة العكسية بين أنزيم الكلوتاثيون بيروكسيديز 1 و بروتين الصدمة الحرارية 90 ألفا. وعدم وجود علاقة بين جميع جينات الأنزيمات المضادة للأكسدة والتعبير الجيني لبروتين الصدمة الحرارية 27 خلال عملية تكون الدم.