دفاع پایان نامه-کارشناسی ارشد

نیما جعفری رستگار

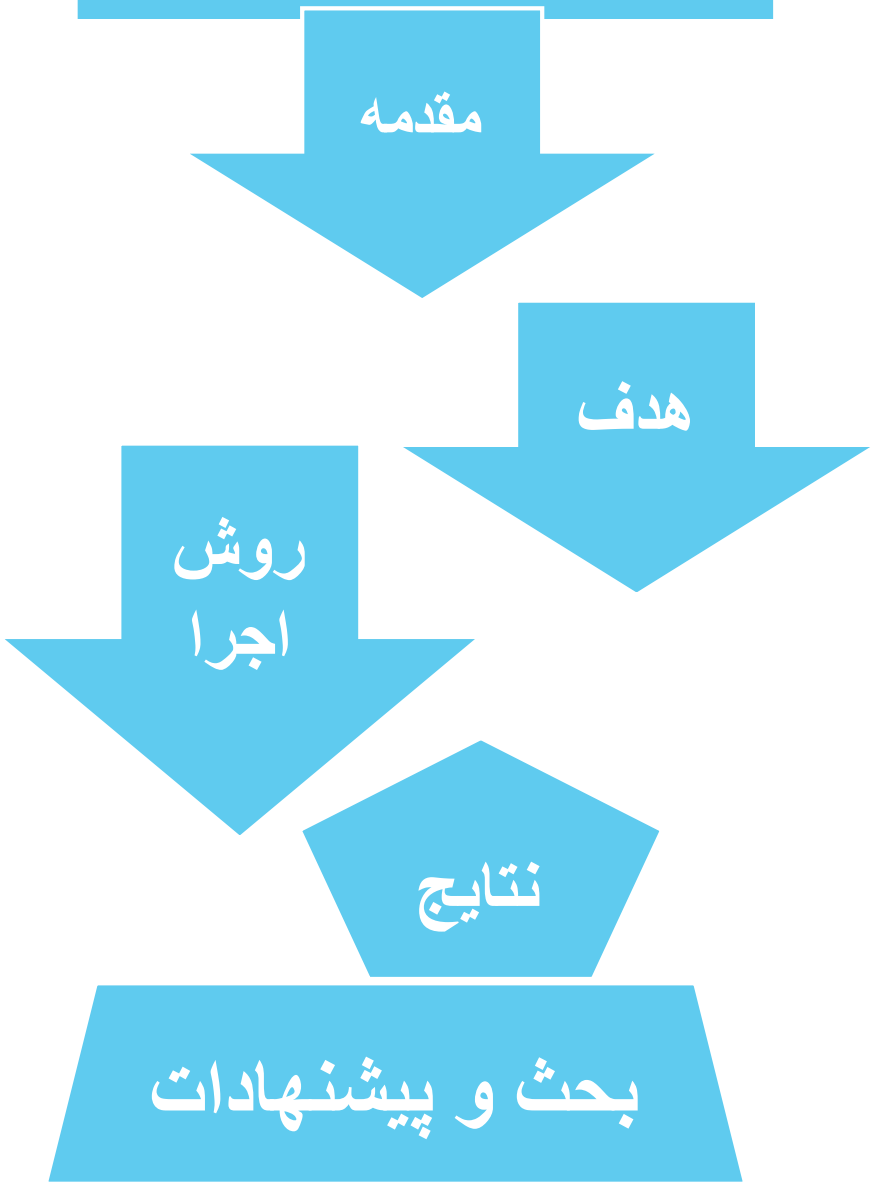
بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم پزشکی تهران
دانشکده علوم و فناوریهای نوین
گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

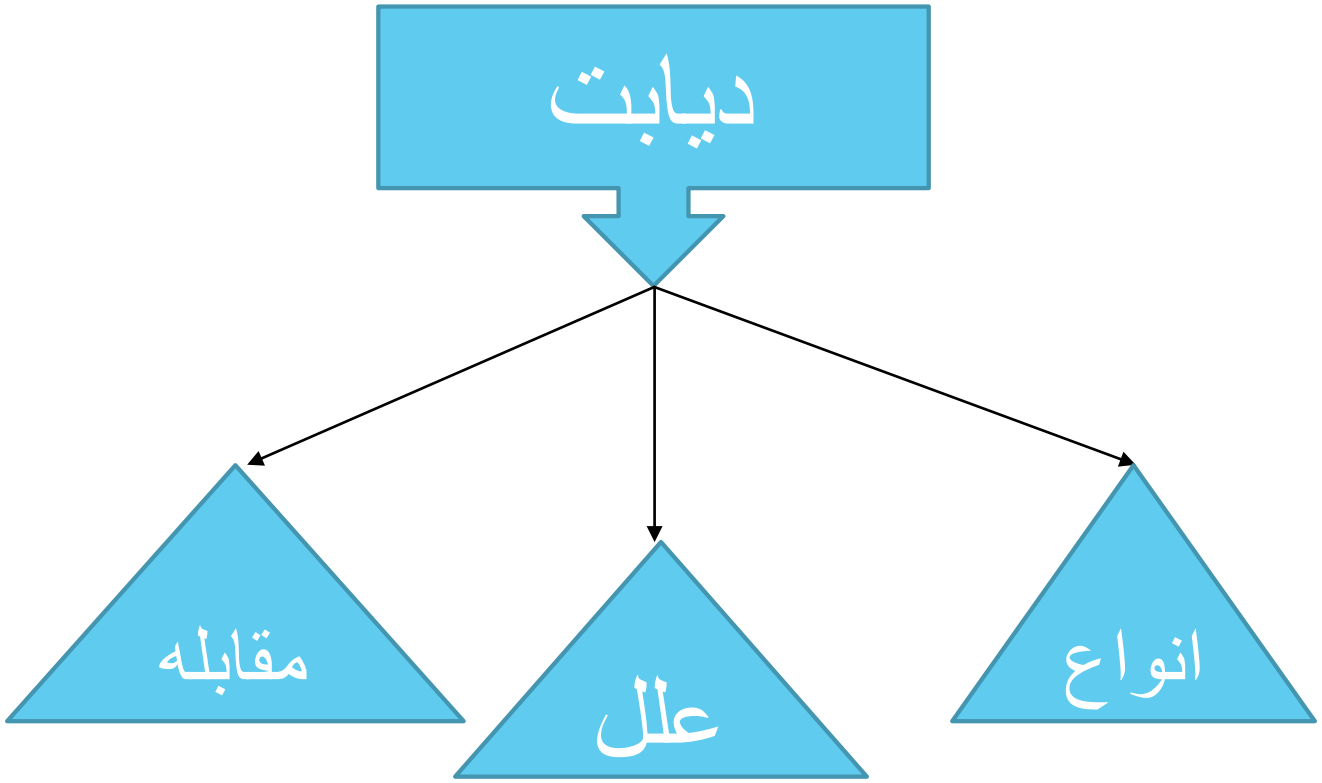
اثر حاملهای نانونیوزومی حاوی تایروزول بر بیان ژنهای PEPCKوGCK دخیل در متابولیسم گلوکز در رت های دیابتی

استادان راهنما:
دکتر مریم ناصرالاسلامی
دکتر فاطمه خاکپای
استاد مشاور:
دکتر ندا موسوی نیری
نگارش:
نیما جعفری رستگار ماه فروردین سال1400

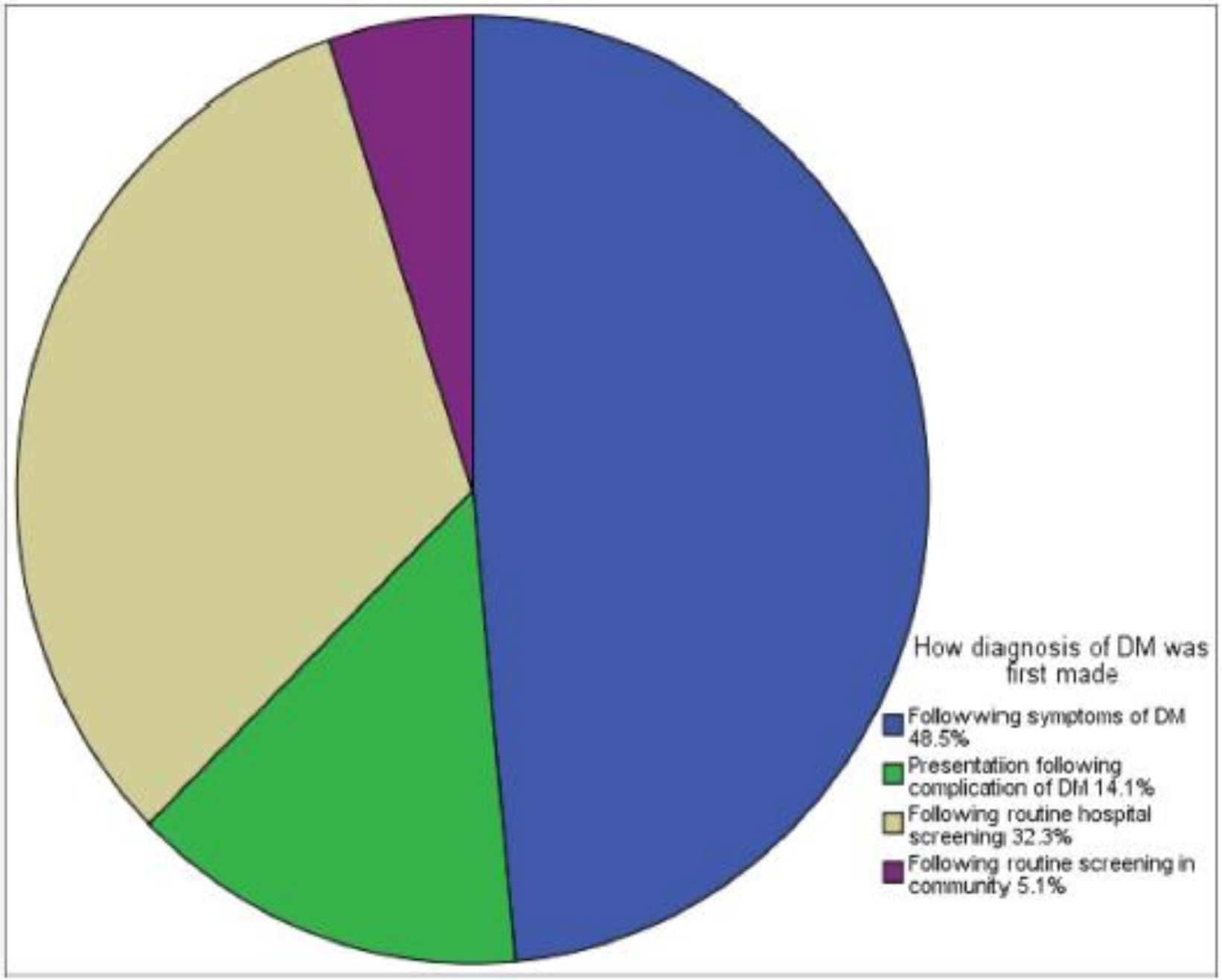
فهرست

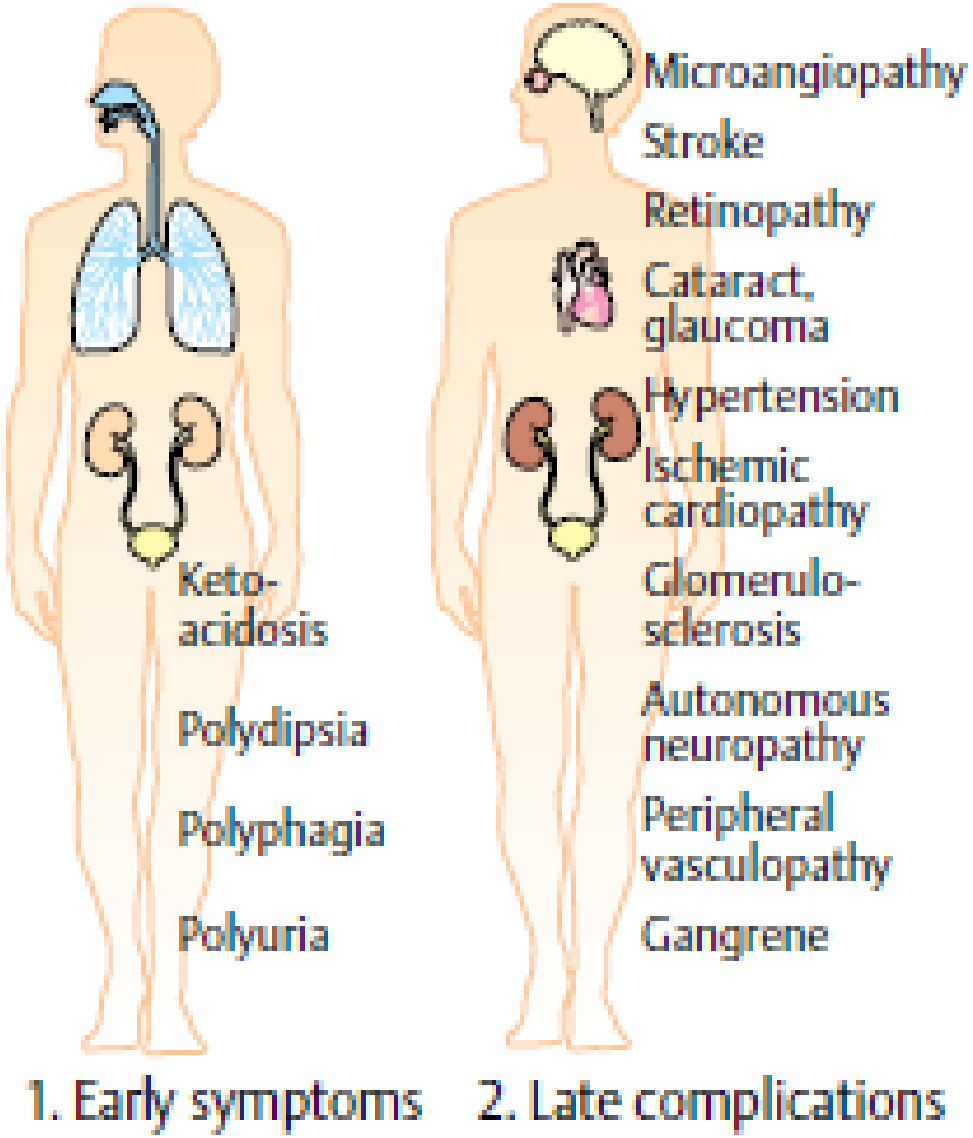


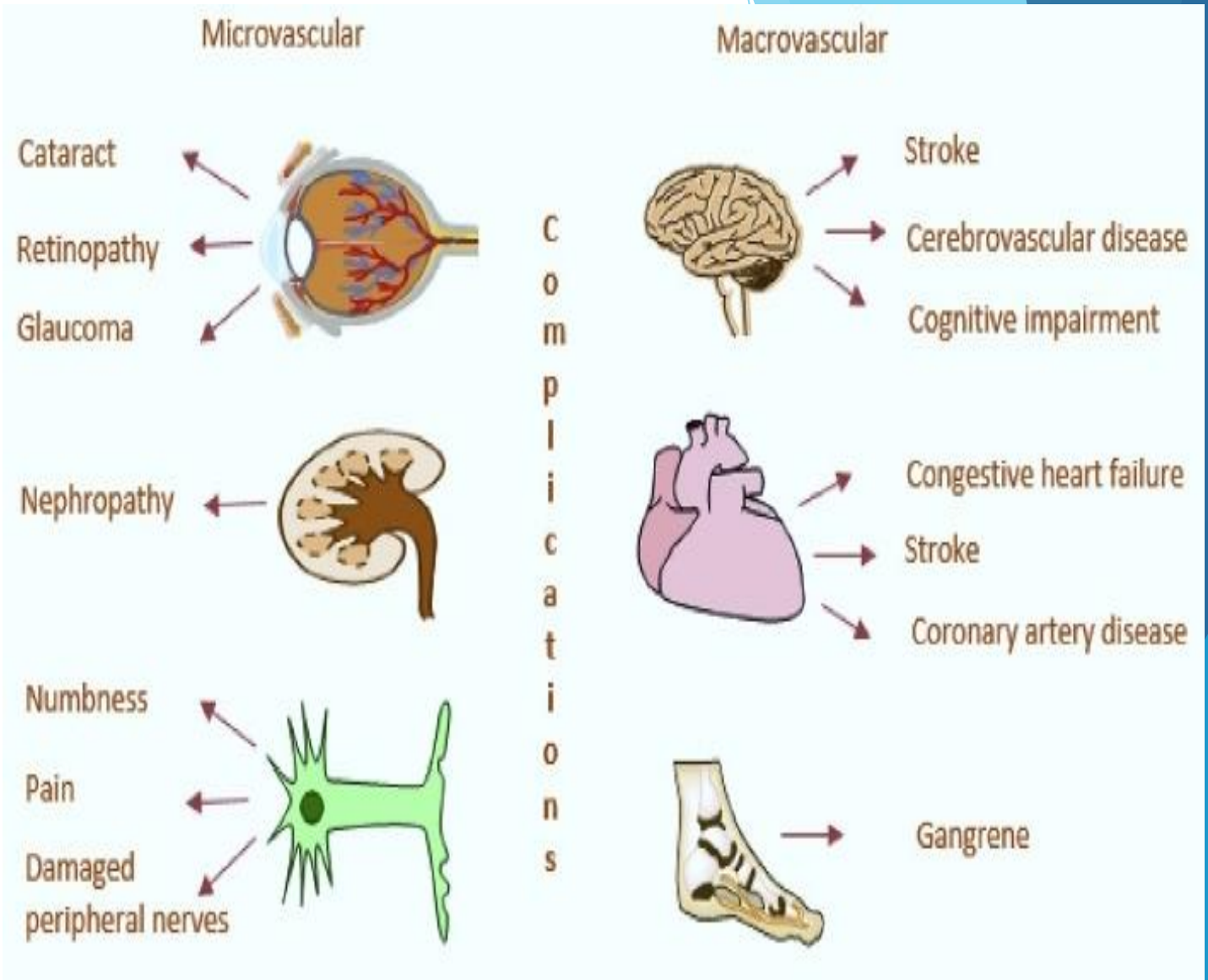
مقدمه

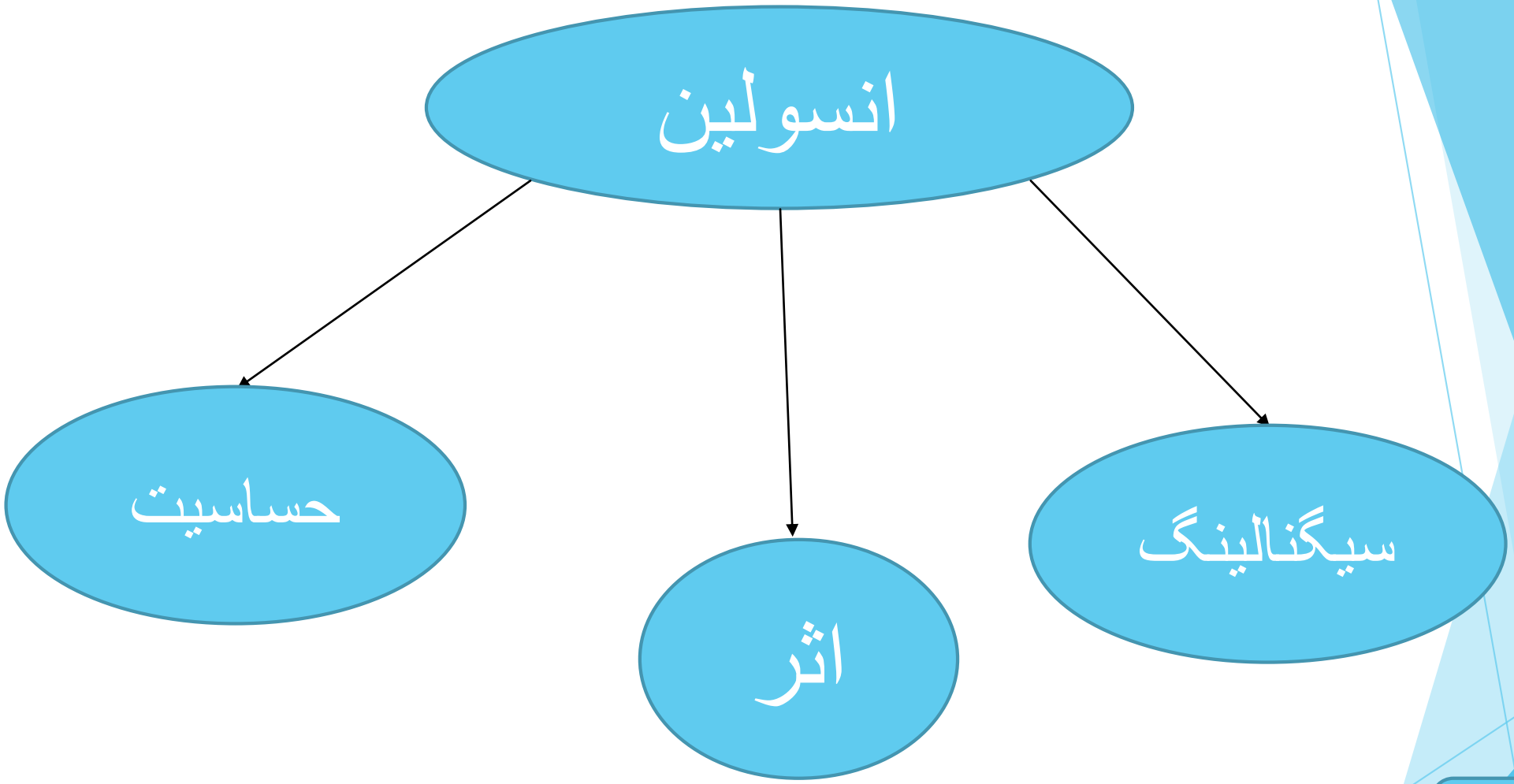


23و59و66و77

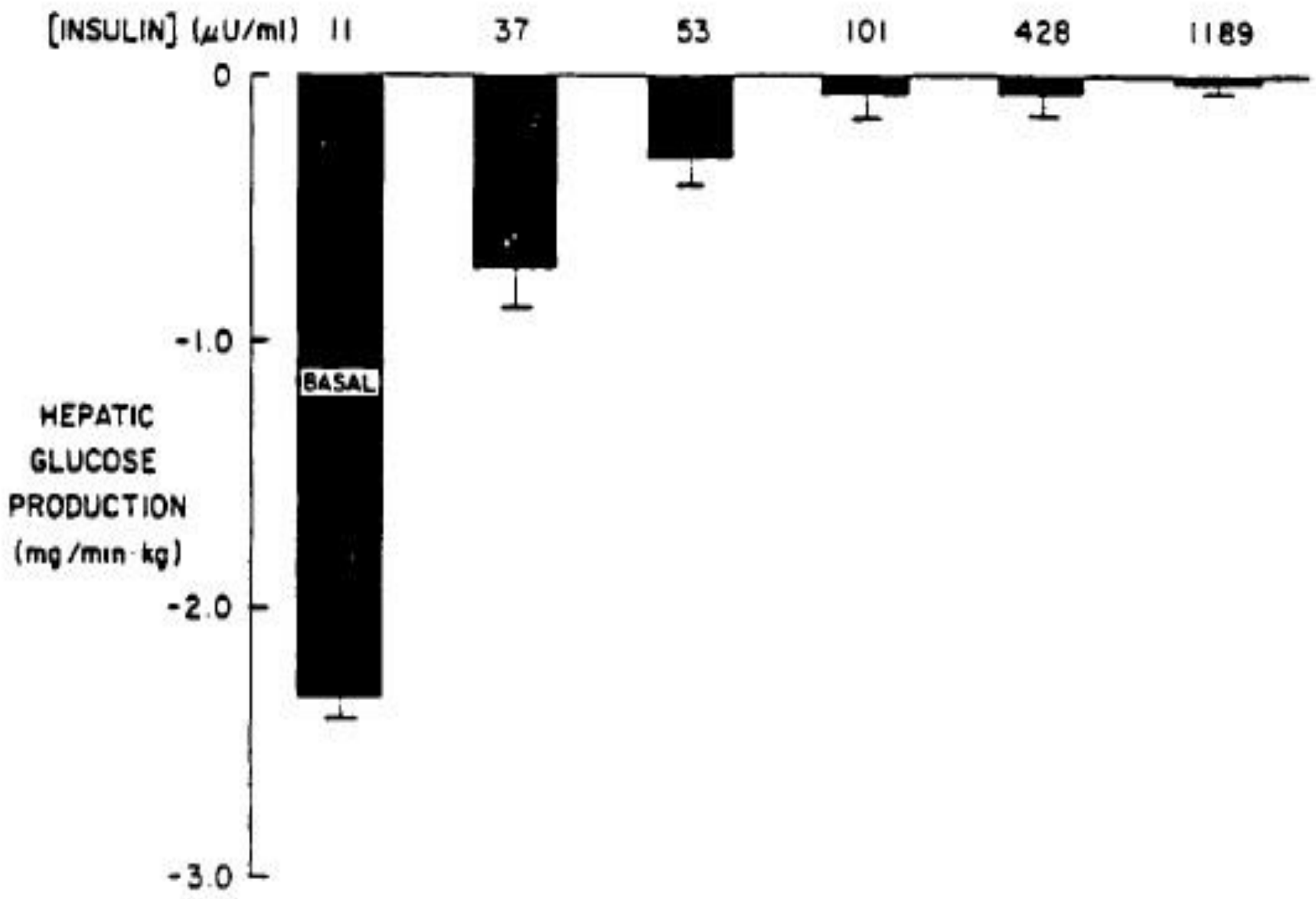

How diagnosis of DM was first made
Followwing symptoms of DM 48.5%
Presentation following complication of DM 14.1%
Following routine hospital screening 32.3%
Following routine screening in community 5.1%

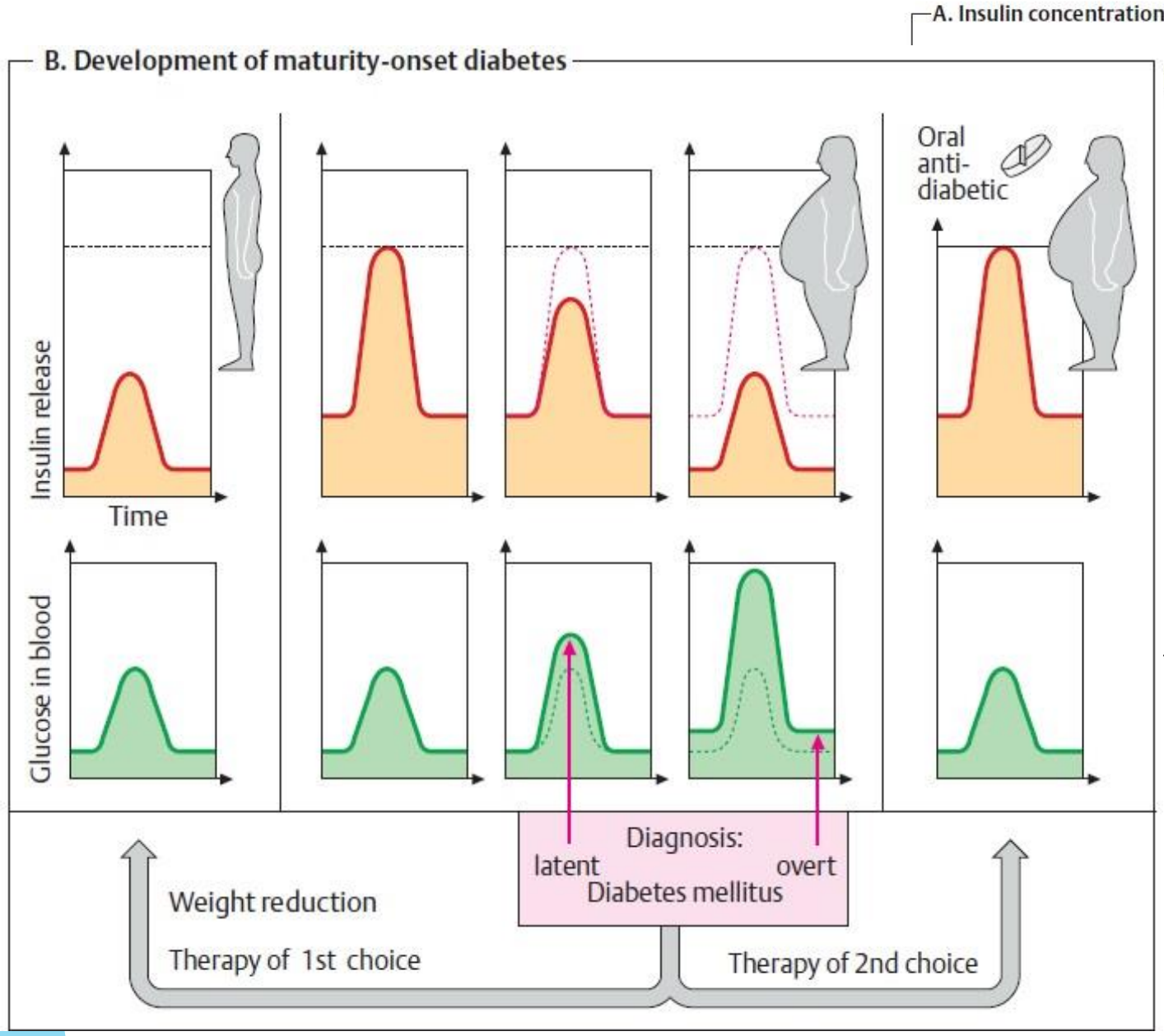

Keto-acidosis
Polydipsia
Polyphagia
Polyuria
Microangiopathy
Stroke
Retinopathy
Cataract, glaucoma
Hypertension
Ischemic cardiopathy
Glomerulo-sclerosis
Autonomous neuropathy
Peripheral vasculopathy
Gangrene
1. Early symptoms
2. Late complications

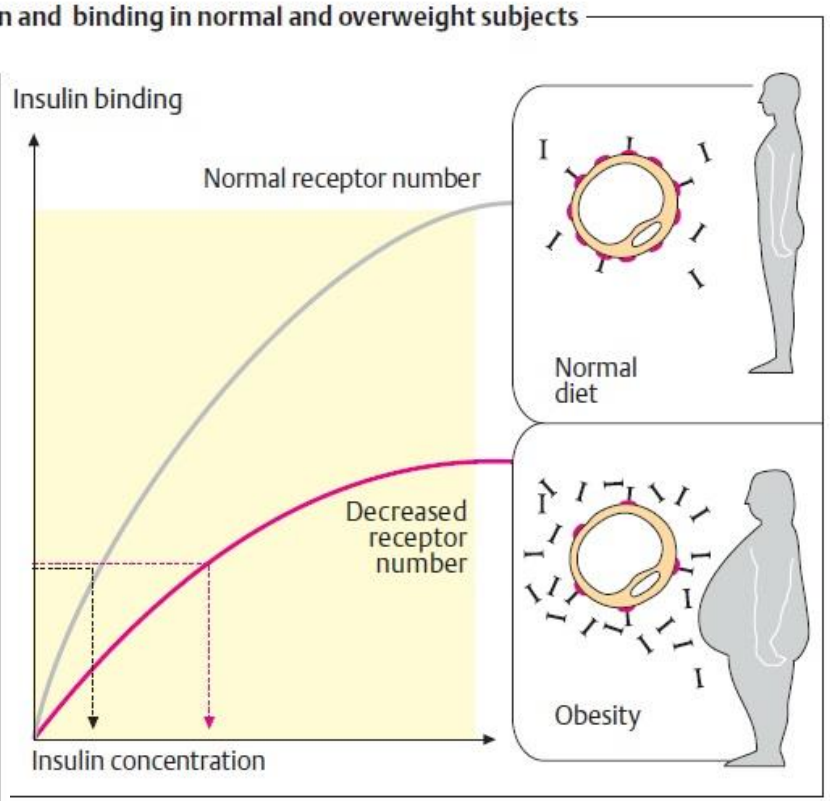

Microvascular
Macrovascular
Cataract
Retinopathy
Glaucoma
Nephropathy
Numbness
Pain
Damaged peripheral nerves
Complications
Stroke
Cerebrovascular disease
Cognitive impairment
Congestive heart failure
Stroke
Coronary artery disease
Gangrene



26و45و56


[INSULIN] (μU/ml)
11
37
53
101
428
1189
0
-1.0
-2.0
-3.0
BASAL
HEPATIC
GLUCOSE
PRODUCTION
(mg/min·kg)


B. Development of maturity-onset diabetes
Insulin release
Time
Oral anti-diabetic
Glucose in blood
Diagnosis:
latent
overt
Diabetes mellitus
Weight reduction
Therapy of 1st choice
Therapy of 2nd choice


A. Insulin concentration and binding in normal and overweight subjects
Insulin binding
Normal receptor number
Decreased receptor number
Insulin concentration
Normal diet
Obesity

17و30و53و59و65

روشهای مقابله با قند خون بالا

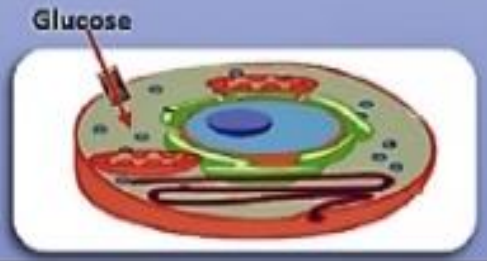
Increase in Insulin Secretion
- Sulfonylureas
- Meglitinides
- Glucagon-like peptide-1 receptor agonists
- Dipeptide pepdidase-4 inhibitors

Decrease glucose absorption from GIT
- α-glucosidase inhibitor
- Dipeptide pepdidase-4 inhibitors

DIABETES MELLITUS

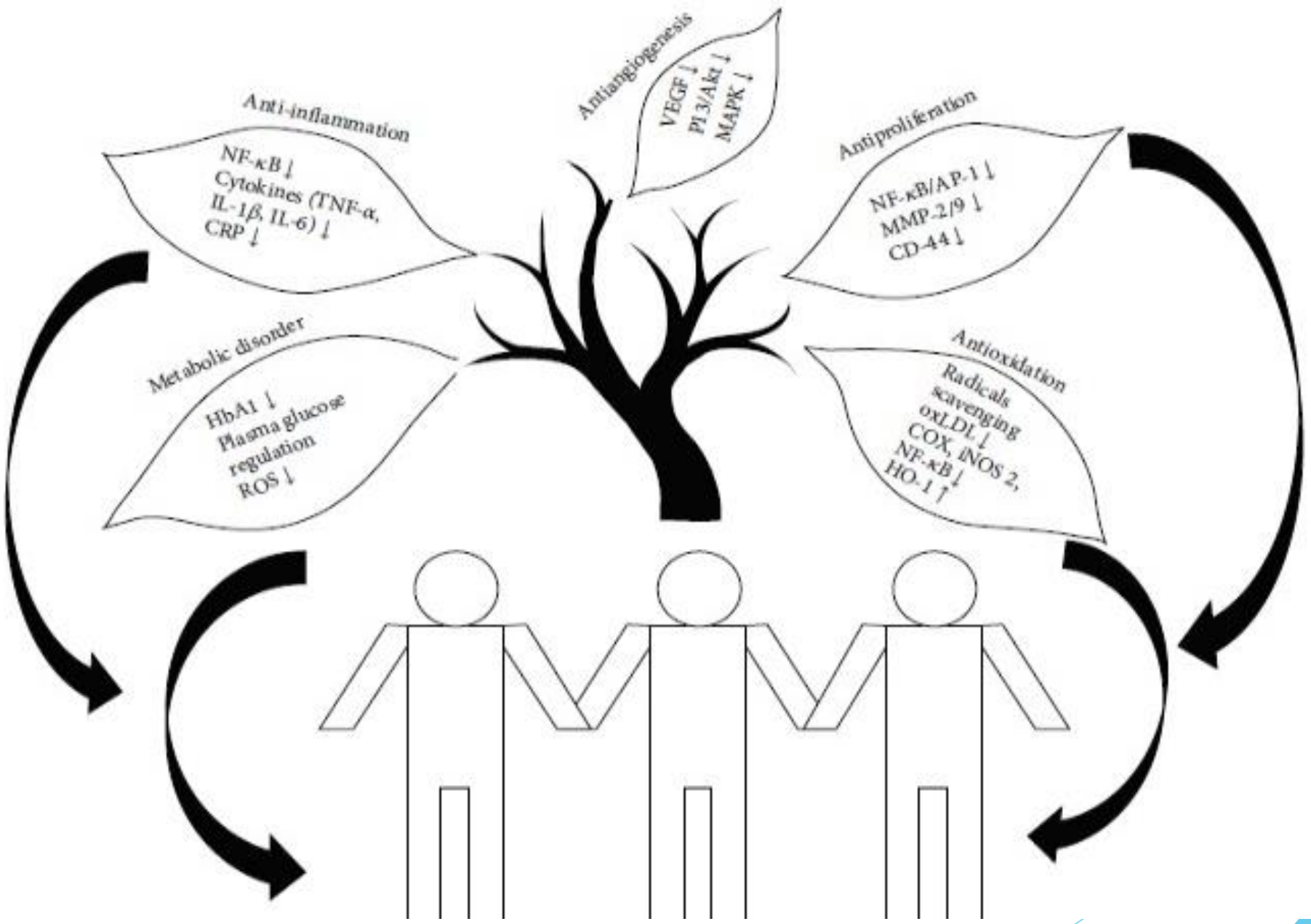
Decrease in glucagon secretion
- Amylin analogue
- α-glucosidase inhibitor
- Dipeptide pepdidase-4 inhibitors

Decrease appetite
- Amylin analogue
- Dipeptide pepdidase-4 inhibitors

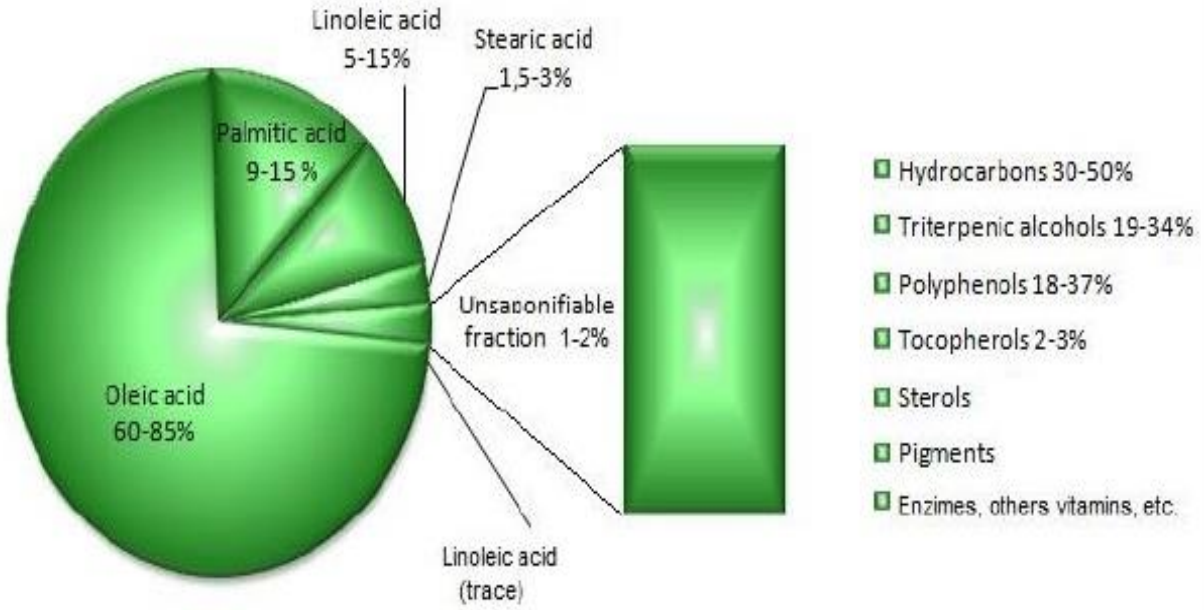


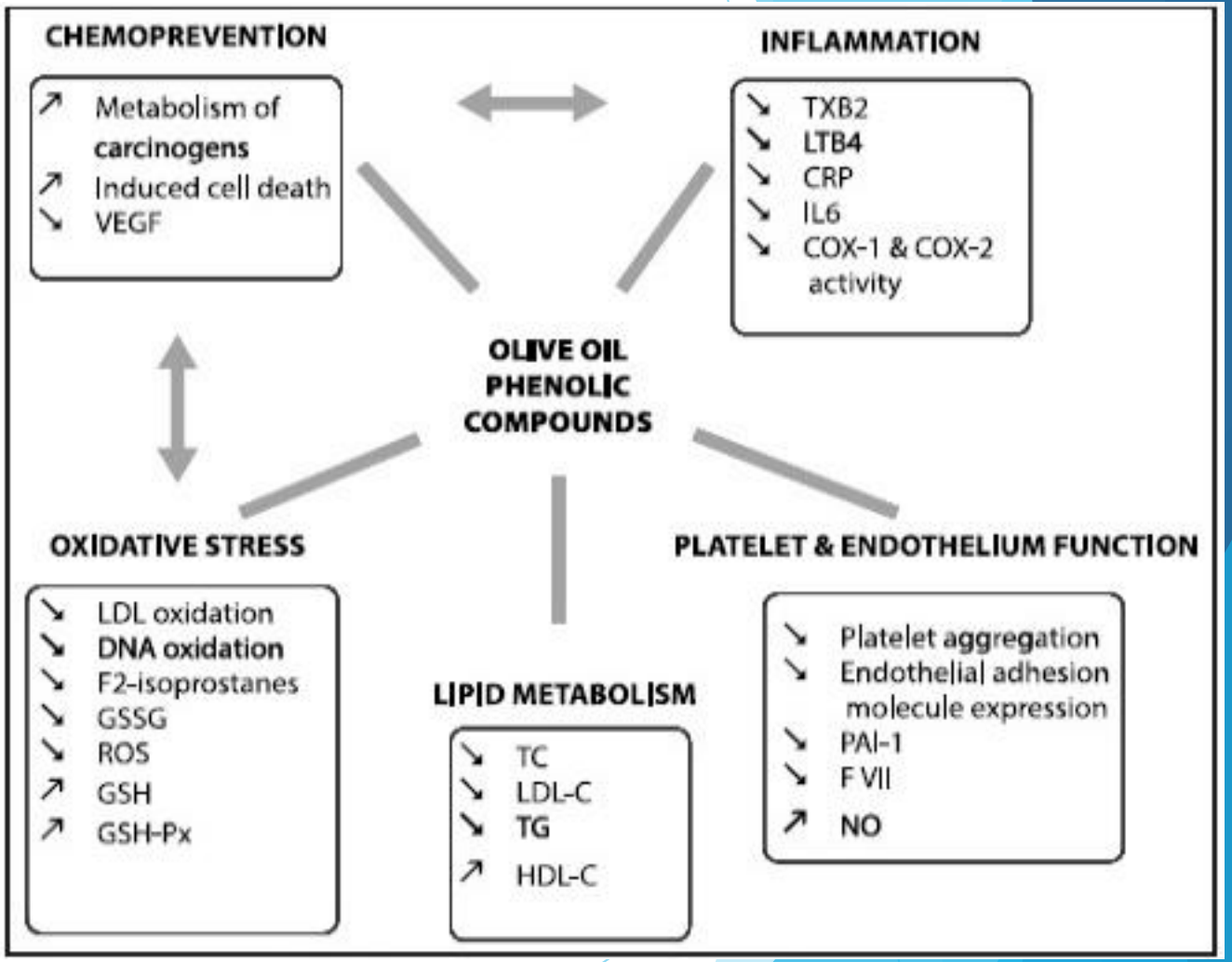
Increase in glucose uptake and utilization
- Thiazolidinediones
- Buguanides

مکانیسم مولکولی پلی فنول ها و فیتوکمیکالها



پلی فنولهای روغن زیتون

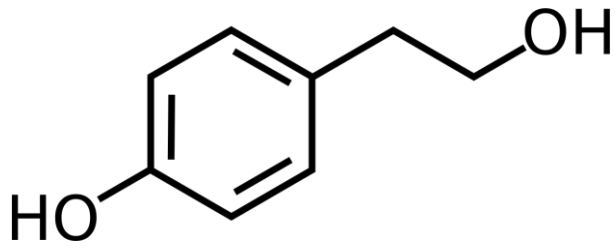




69 54 5

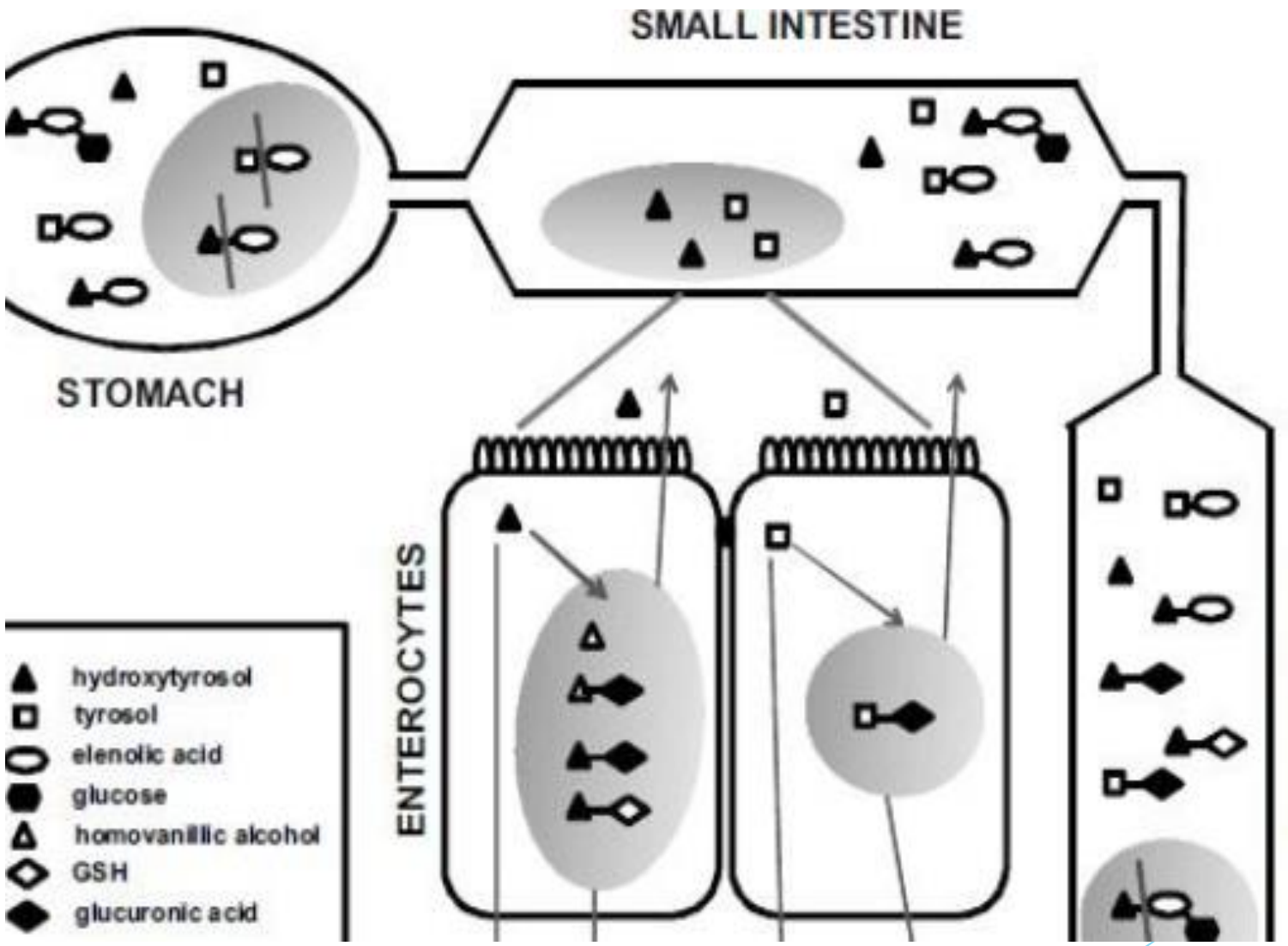
تایروزول

Polyphenol	Quantity	Olive Oil Type
Hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenyl ethanol) (HT)	0.93–14.64 mg/kg	Olive oil (various brands)
Tyrosol	0.25–14.97 mg/kg	Olive oil (various brands)
Oleuropein	0.0–4.7 mg/kg	Virgin olive oil

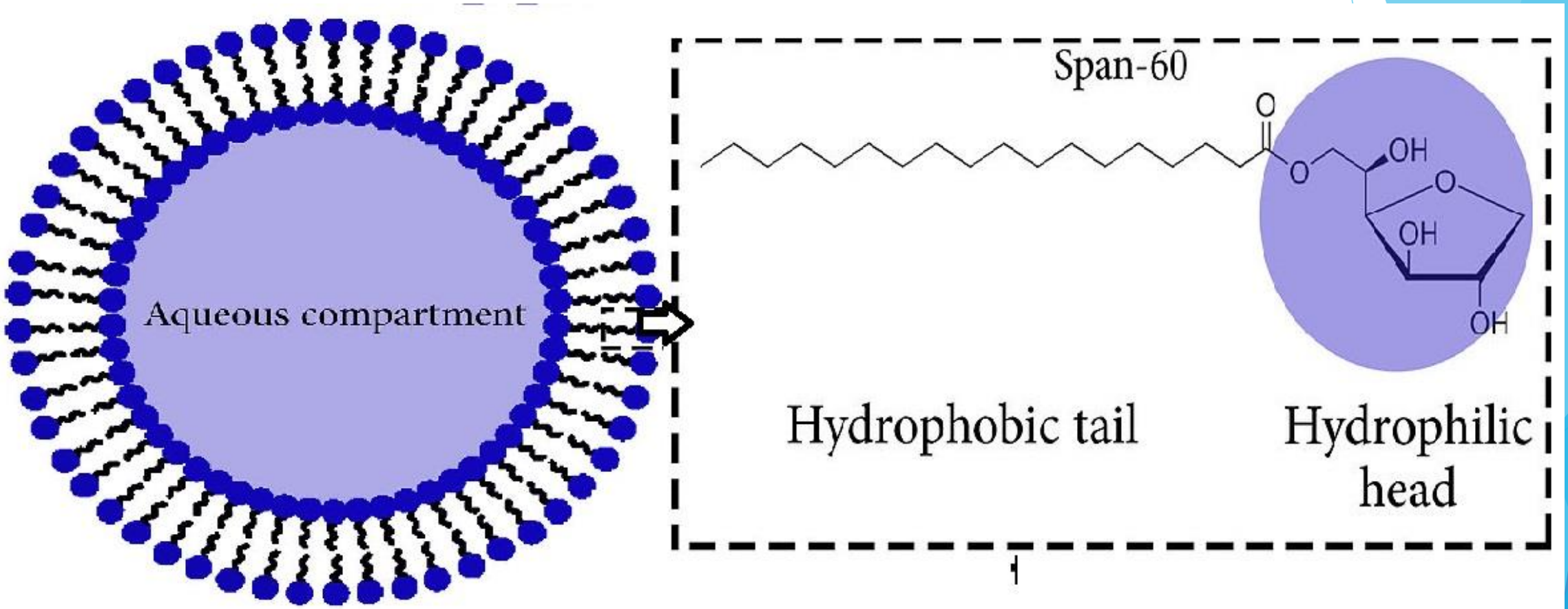


42و24

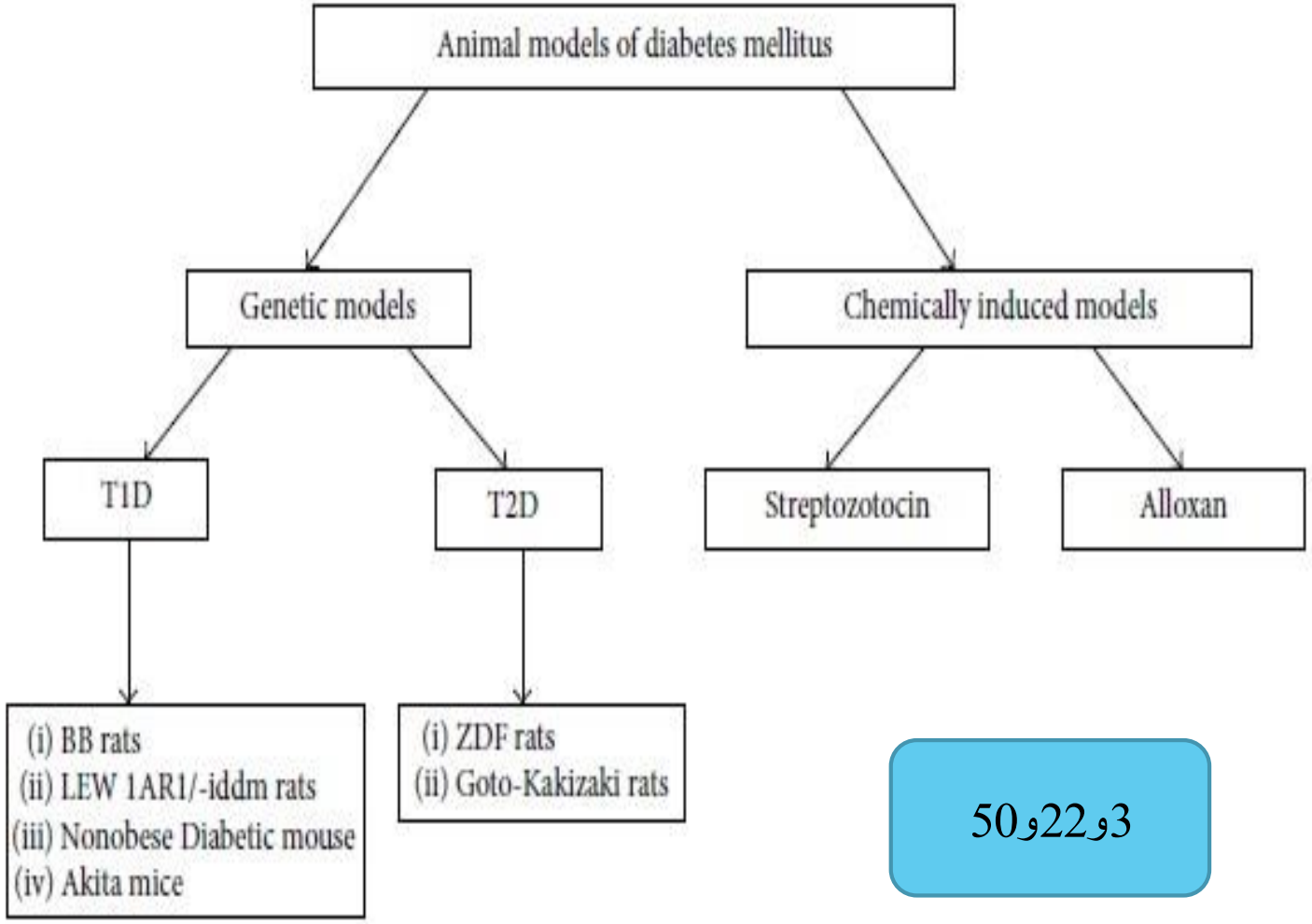
جذب تایروزول



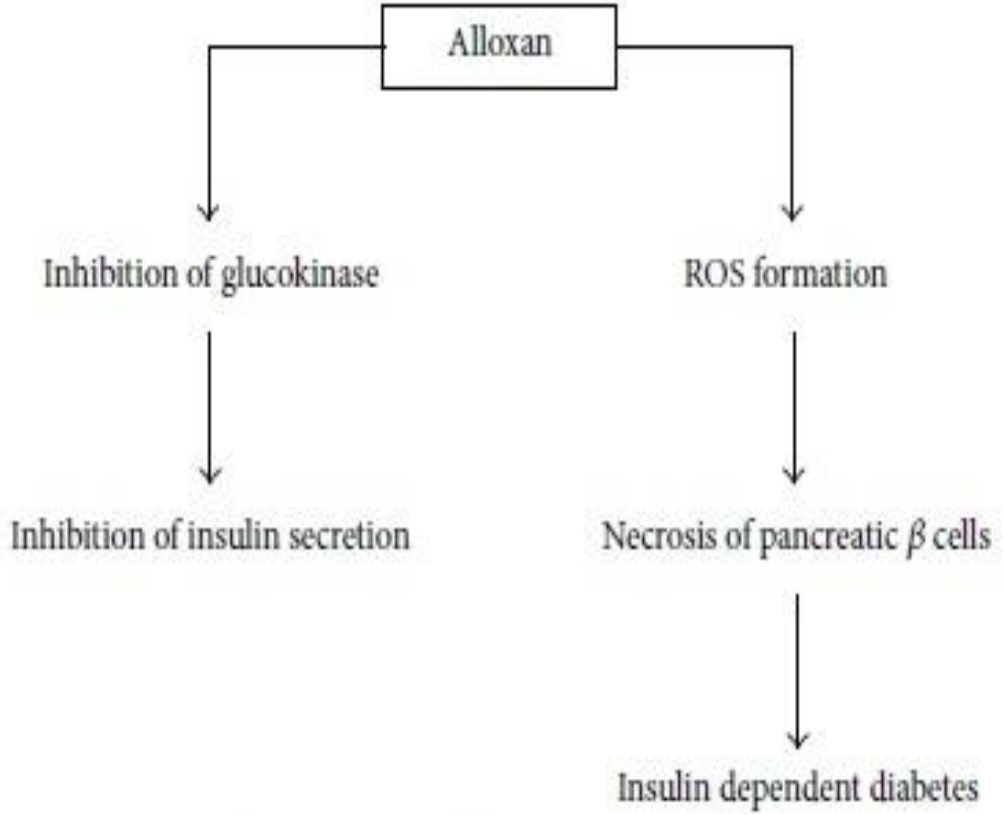
حامل دارویی(نانونیوزوم)

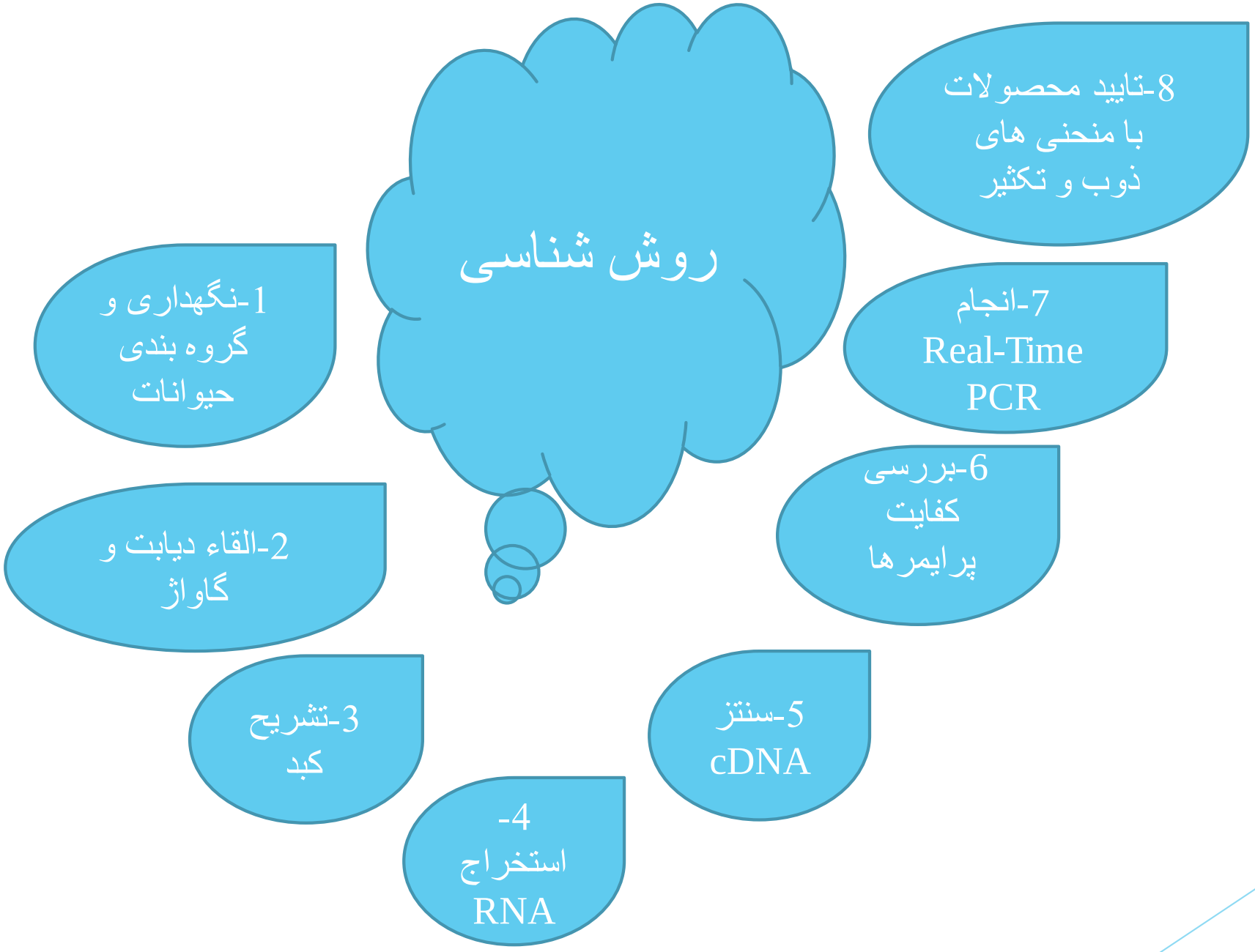


مدل های دیابت



3و22و50




روش شناسی
1-نگهداری و گروه بندی حیوانات
2-القاء دیابت و گاواژ
3-تشریح کبد
4- استخراج RNA
5-سنتز cDNA
6-بررسی کفایت پرایمرها
7-انجام Real-Time PCR
8-تایید محصولات با منحنی های ذوب و تکثیر

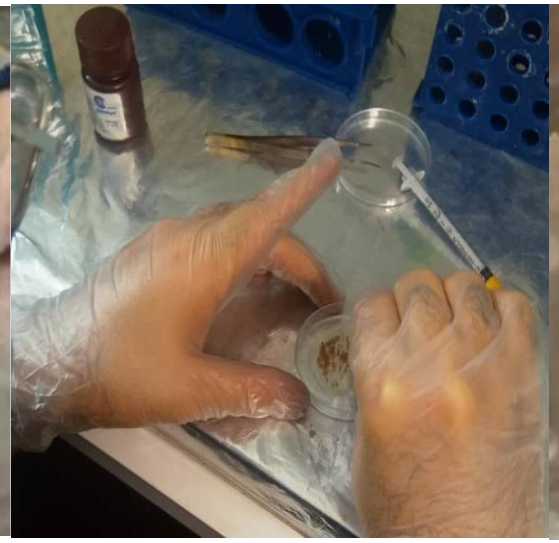
1-نگهداری و گروه بندی حیوانات

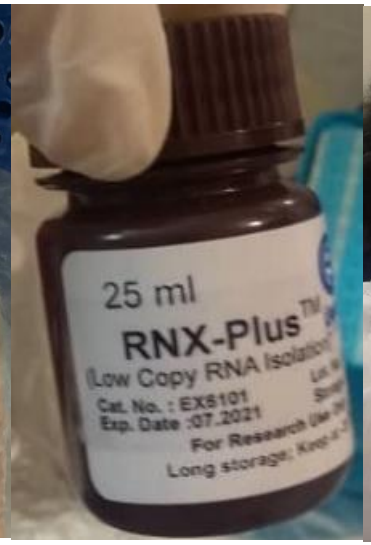
گروه کنترل سالم	آب + غذا
گروه شم(کنترل دیابتی نوع2)	آب + غذا + گاواژ 1 روزانه 1 ccنرمال سالین
گروه کنترل نیوزوم	آب + غذا + گاواژ 1 روزانه cc1 نیوزوم
گروه تایروزول	آب + غذا + گاواژ 1 روزانه cc1 تایروزل
گروه نانوتایروزول	آب + غذا + گاواژ 1 روزانه cc1 تایروزول نیوزومه

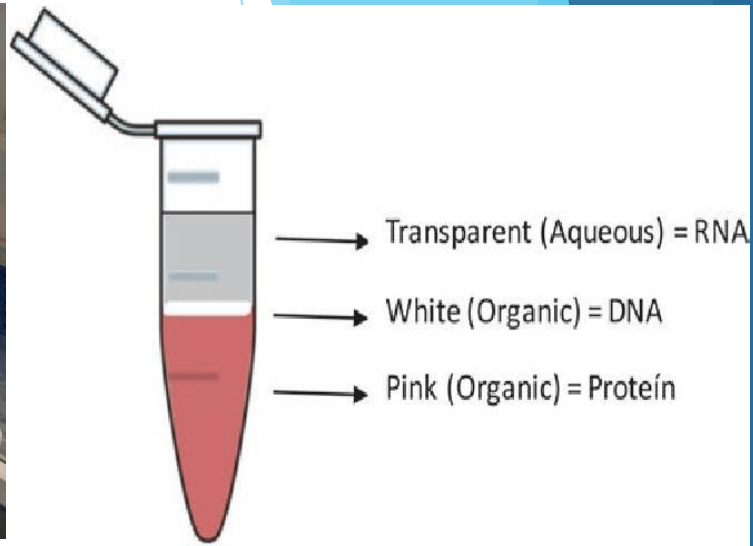
2-القاء دیابت و گاواژ

3-تشريح كبد

4-استخراجRNAباکیت
(Cat No # Total A101212; Lot # 1441)





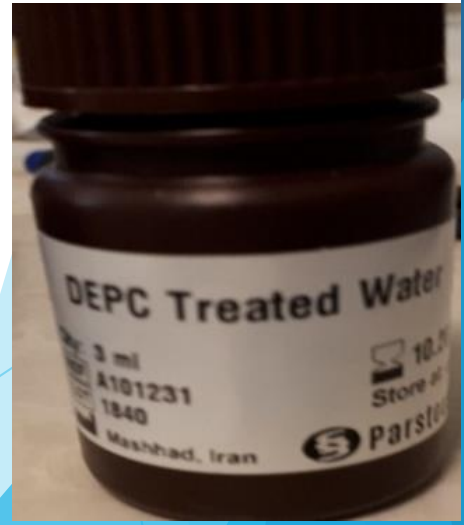


1-برش،تکه تکه و لیز کردن بافت 2 – 700افزودن لاندا RNX-plus

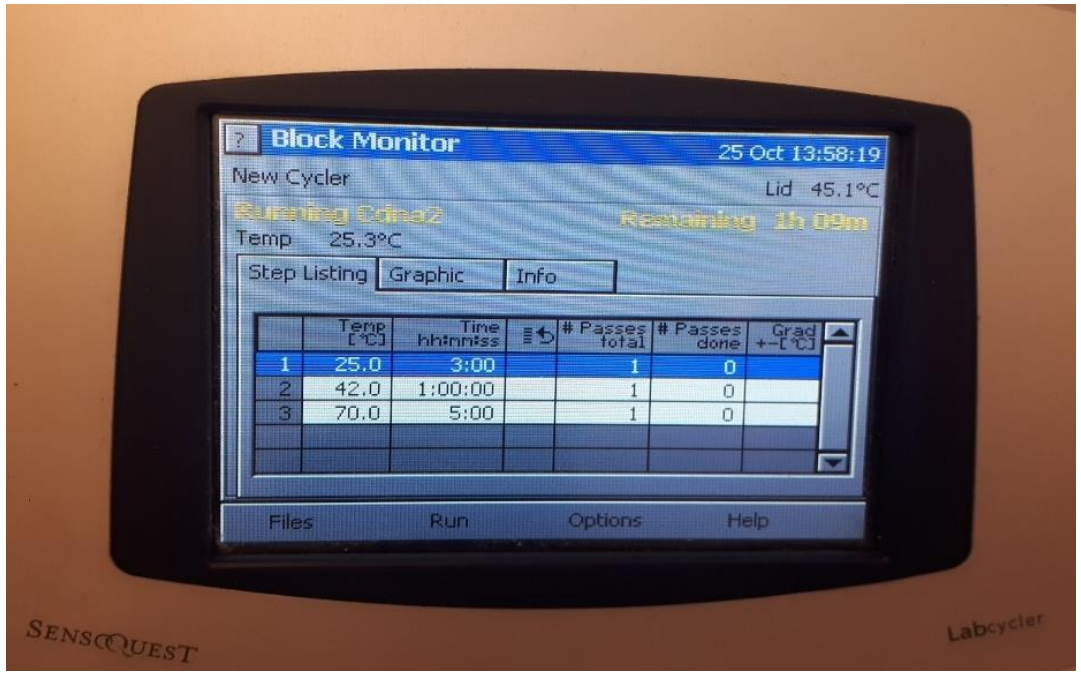
Vortex-3 4 - 200 لاندا کلروفورم 5 -سانترفیوژ و برداشتن فاز رویی

6- 600 الی 700 لاندا ایزوپروپانول و سانترفیوژدوباره

7- 600 لاندا الکل 70 درصد به رسوب حاصله 8-اضافه کردن DEPC Treated water

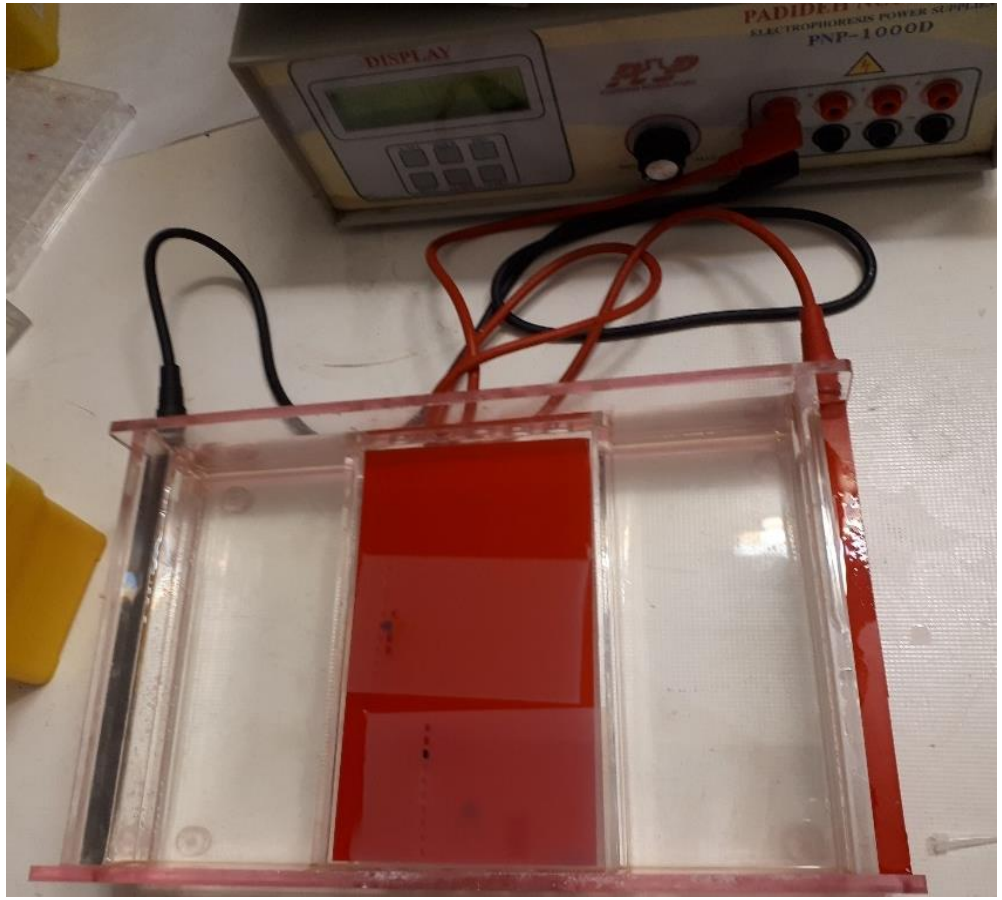


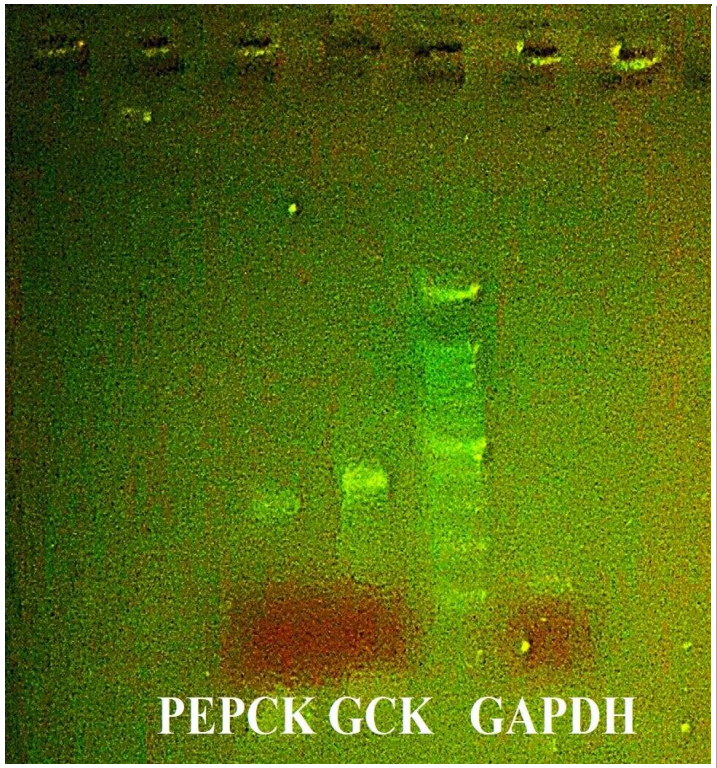
5-سنتزcDNA

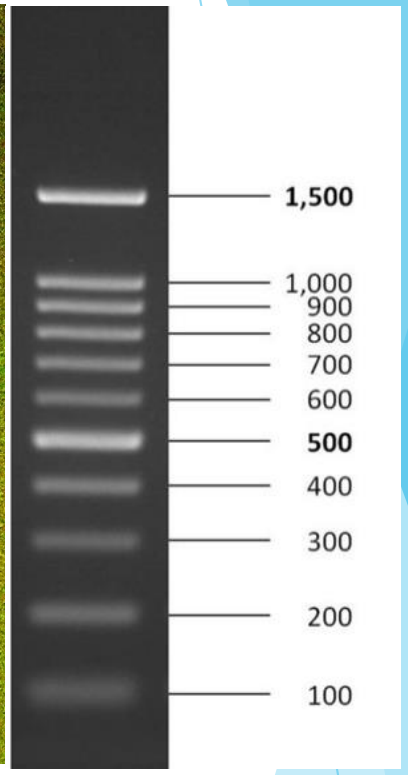


- 10لاندا از **RNA**ی نمونه
- 1 لاندا آنزیم DNase ، 2 لاندا بافر آنزیمDNase ، 7 لاندا آب
- دستگاه ترموسایکلر با دمای 4 و 25 درجه سانتیگراد به ترتیب به مدت 1 ساعت و 9 دقیقه
- 10 لاندا از محتویات آن را به یک میکروتیوپ جدید منتقل و به ترتیب 1 لاندادNTP ، 1 لاندا پرایمر،4 لاندا بافر RT،0.5لاندا آنزیم RTو 3.5لاندا DDW
- برنامه دمایی 3 و 26 درجه سانتیگراد و مدت زمان1ساعت و 9 دقیقه

6-بررسی کفایت پرایمر ها







از چپ به راست ژن
-PEPCK(290bp)-GCK(350bp)
GAPDH(130bp)

Gene	Foward	Reverse	Size
PEPCK	TTGAGATTTTGTAGAGCACA	TCTATCACAGCTCTGGAAAT	290 bp
GCK	ATATTTTTTTAGGATTTGCC	ATATCACTCTCTTCGCGAAT	350 bp
GAPDH	ATTCTCTGATTTGGTCGTATT	TTTCATGGTGGAATCATATT	130 bp

7-انجامReal-Time PCR

cycles	Duration	Temperature(centigrade)
1	5minutes	95
40	15 seconds	52
	10seconds	95
	15seconds	72

1.یک Mixبه حجم 20لاندا در میکروتیوب درست کردیم.میزان Mixلازم برای هر نمونه در جدول آمده است.

ترکیبات	میزان
cDNA	30لاندا
پرایمر برایGAPDH,GCK,PEPCK	1.5لاندا
Master Mix	10لاندا
DDW	5.5لاندا

2.یک Mixکلی از همه ترکیبات به جز cDNAدر سه میکروتیوب درست کردیم.در هر میکروتیوب 52.5لاندا از یکی از پرایمرها(GAPDH/PEPCK/GCK)،350 لاندا MasterMix و 193 لاندا DDWاضافه کردیم.

3.به تعداد نمونه هایمان میکروتیوب برداشته و به هر یک 17لاندا از میکس ساخته شده در مرحله قبلی و 3لاندا از cDNAافزودیم تا حجم آن به 20 لاندا برسد.

4.ترکیب کلی را به مدت 87 دقیقه در دستگاه ریل-تایم خود،Easy-Plex ANALYZER rota-Gene،قرار دادیم.

آنالیز داده های آماری

- داده های این مطالعه با استفاده از نرم افزار **Prism GraphPad**و **SPSS** مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) وT Test بررسی شدند.
- مقایسه ی بیان ژن ها بین گروه های تیمار با کنترل از روش دلتای دلتا سی تی انجام شد.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\,(\text{نمونه}2) - \Delta Ct(\text{نمونه}1)$$

- p value یا سطح معنا دار بودن، **($p< 0.05$)** در نظر گرفته شد.

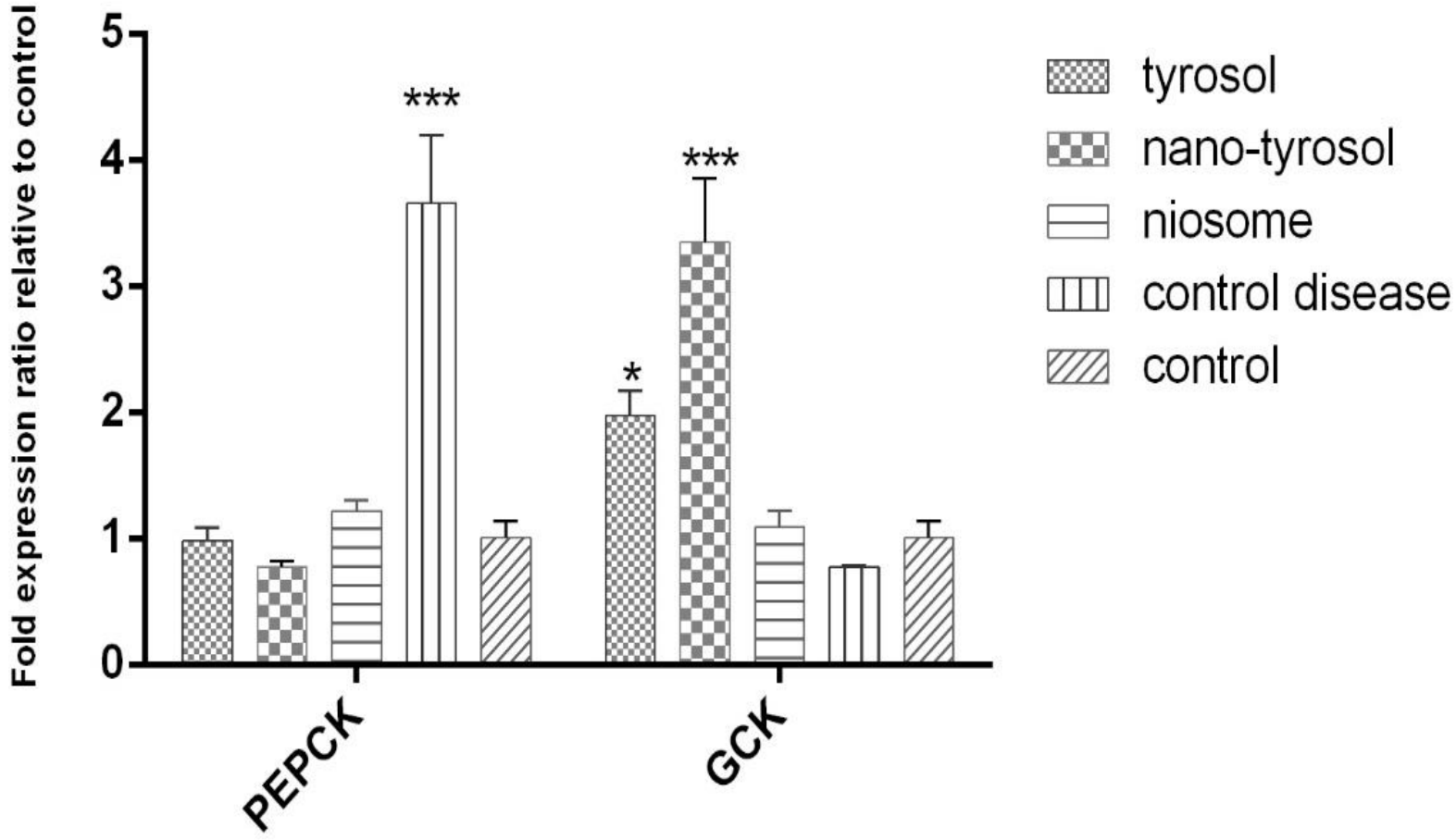
نتایج

- **اثر گاواژ 36 روزه ی تایروزل و تایروزول نانونیوزومه بر وزن بدن و غلظت گلوکز خون در رتهای دیابتی شده با STZ:**

در این بررسی نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان میدهد که تزریق استرپتوزتوسین و القاء دیابت اندکی کاهش وزن ایجاد کرده،گاواژ نانونیوزوم از آنجایی که دارو نبوده نتوانسته مانع کاهش وزن نمونه دیابتی بشود، تایروزول و نانونیوزم تایروزول باعث جلوگیری از کاهش وزن نمونه های دیابتی شده اند و وزن را تا حد گروه کنترل سالم نزدیک کردند.($p< 0.05$).

همچنین تزریق استرپتوزتوسین باعث افزایش معنی‌دار قند خون نسبت به گروه کنترل($p< 0.001$) می‌شود.گاواژ نانونیوزوم به تنهایی نمیتواند از افزایش قند خون در رتهای دیابتی شده با استرپتوزتوسین جلوگیری کند اما گاواژ تایروزول نانونیوزومه توانست قند خون را تا محدوده گروه کنترل نزدیک کند و البته گاواژ تایروزول به تنهایی، نیز سبب کاهش قند خون در مقایسه با گروه شاهد دیابتی (گروه شم) شد.

کسر بیان نسبی ژنهای PEPCK&GCK



مقایسه ی بیان ژن PEPCK

Group	Ct	fold change	comment	summary
Control	22.1	1.00539124	reference	-
Diabetic control	21.445	3.65431597	increased	-
Nano-niosome	23.725	1.21925328	unchanged	-
Tyrosol	25.3917	0.98685996	decreased	***
Tyrosol Nanoniosome	25.43	0.77529196	decreased	***

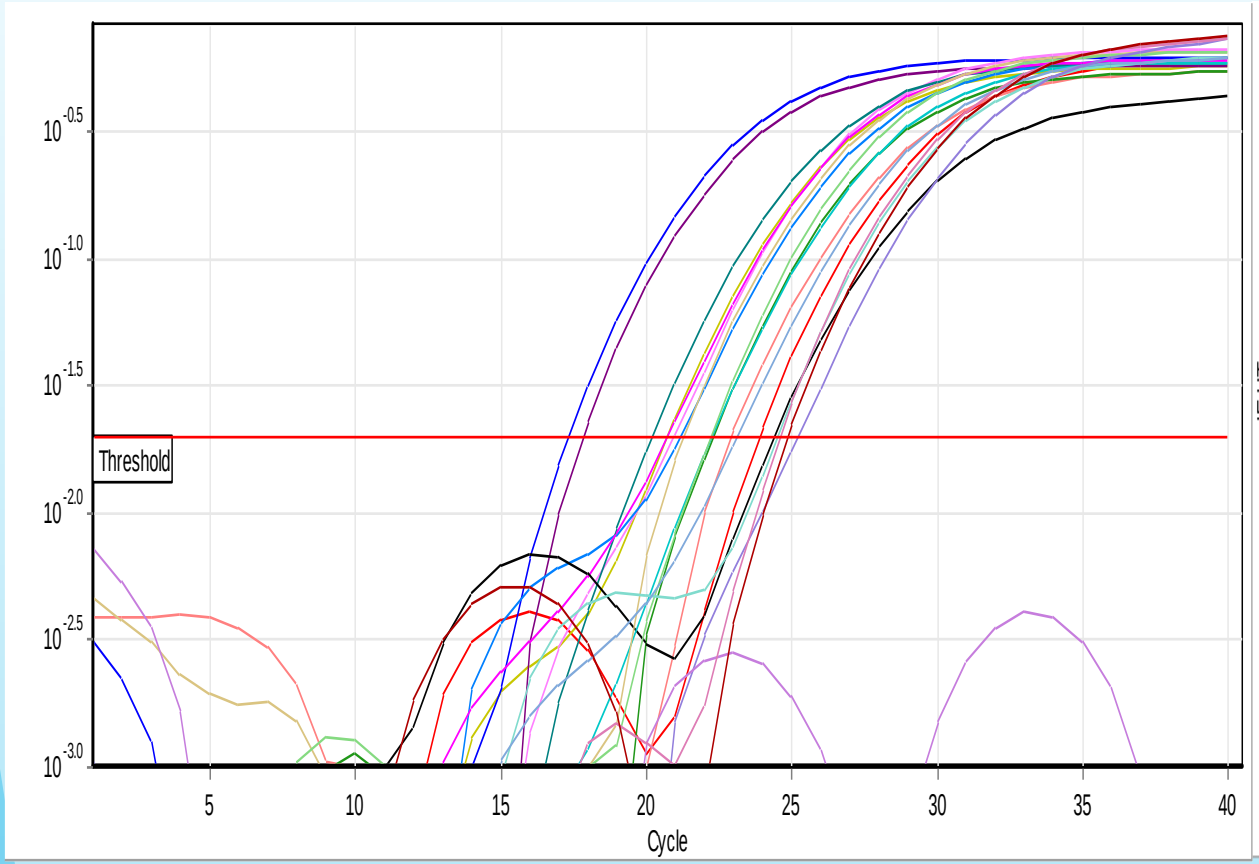
گروه دریافت کننده تایروزل و نانوتایروزول نسبت به گروه کنترل و شم کاهش بیان ژن داشته است که با $p<0.001$*** معنادار است؛تغییرات بیان ژنی بررسی شده در گروه نانوتایروزول بیشتر از تایروزول خالی بوده است.

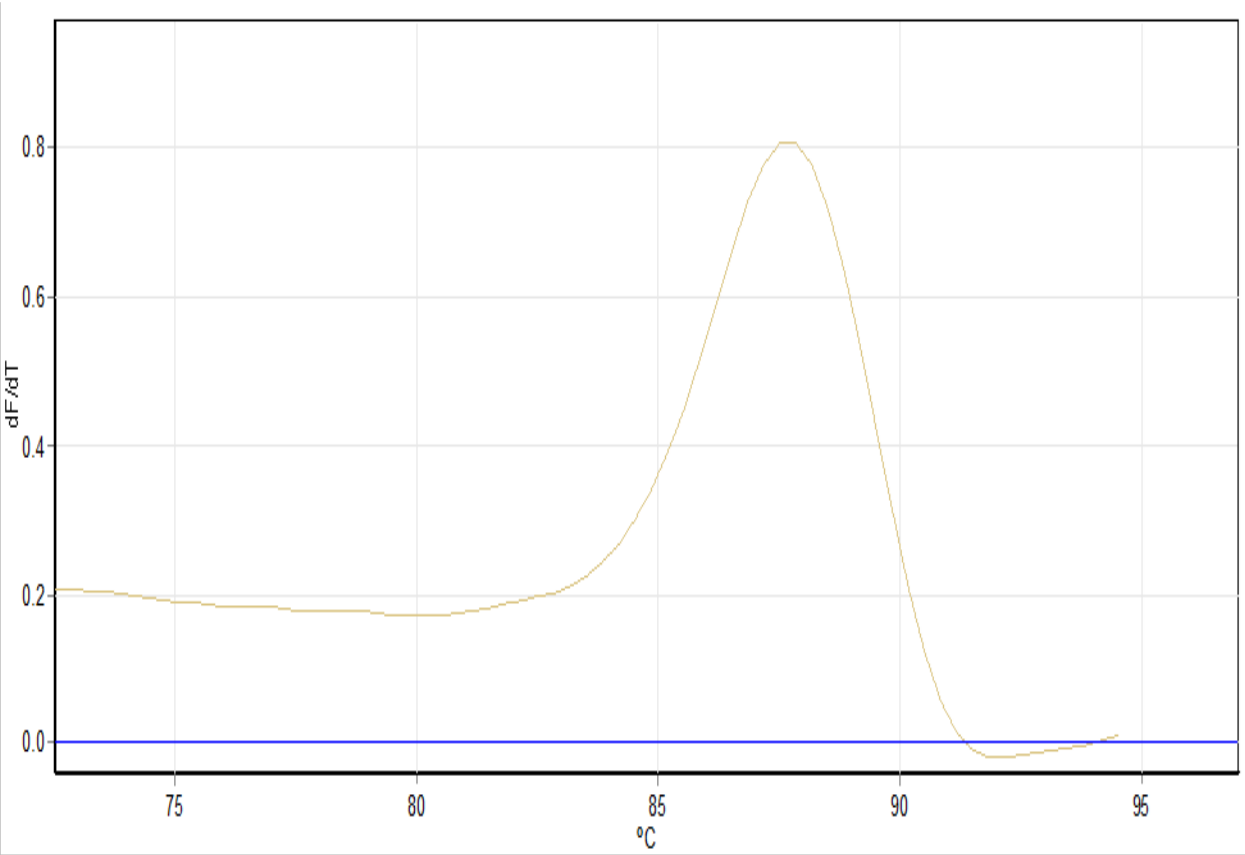
مقایسه ی بیان ژن GCK

Group	Ct	fold change	comment	summary
Control	22.11	1.00574274	reference	-
Diabetic control	23.685	0.77300515	decreased	-
Nano-niosome	23.905	1.08756816	unchanged	-
Tyrosol	24.4	1.97544678	increased	*
Tyrosol Nano-niosome	23.34	3.34957048	increased	***

گروه دریافت کننده تایروزل و نانوتایروزول نسبت به گروه کنترل و شم با افزایش بیان ژن داشته اند که با* $p< 0.05$ *** $p< 0.001$ معنادار است؛تغییرات بیان ژنی بررسی شده در گروه نانوتایروزول بیشتر از تایروزول خالی بوده است

نمودار منحنی ذوب و تکثیر ژنGAPDH

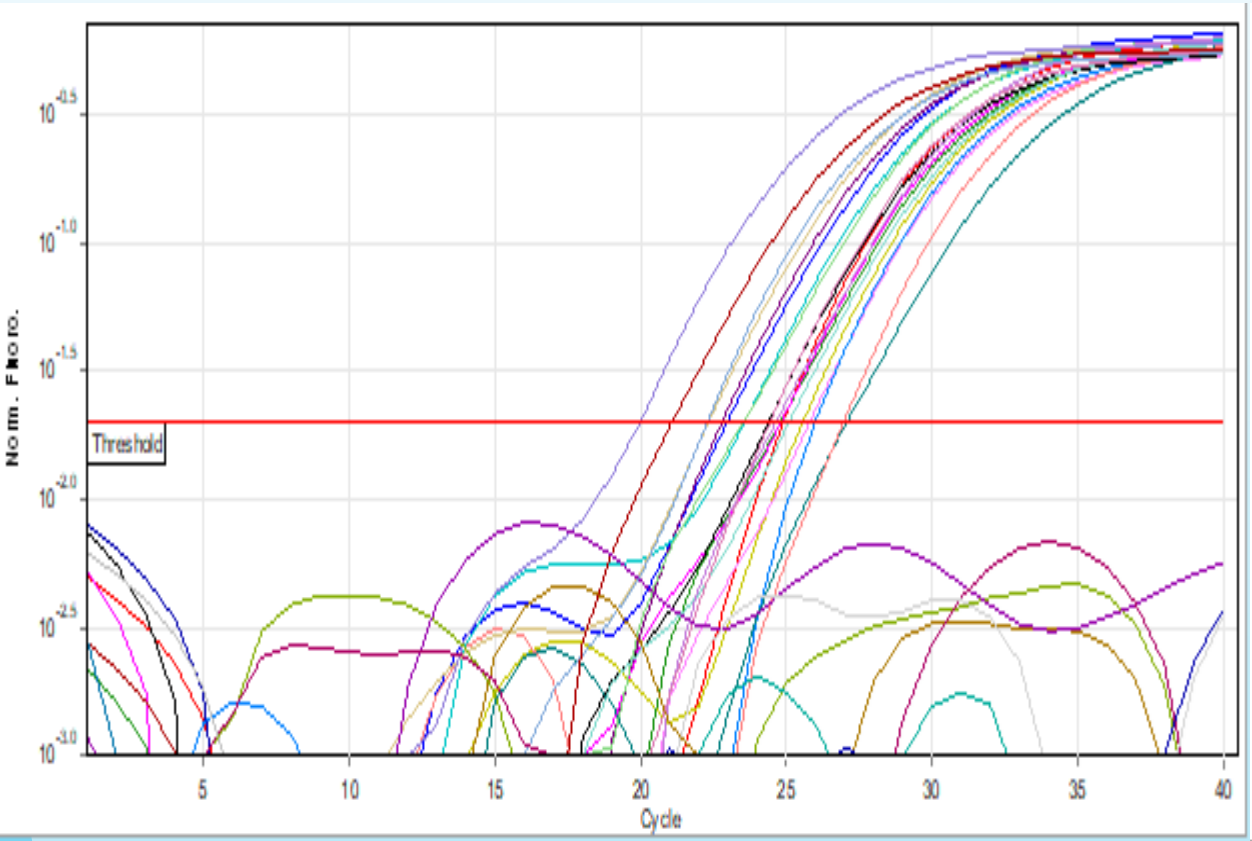


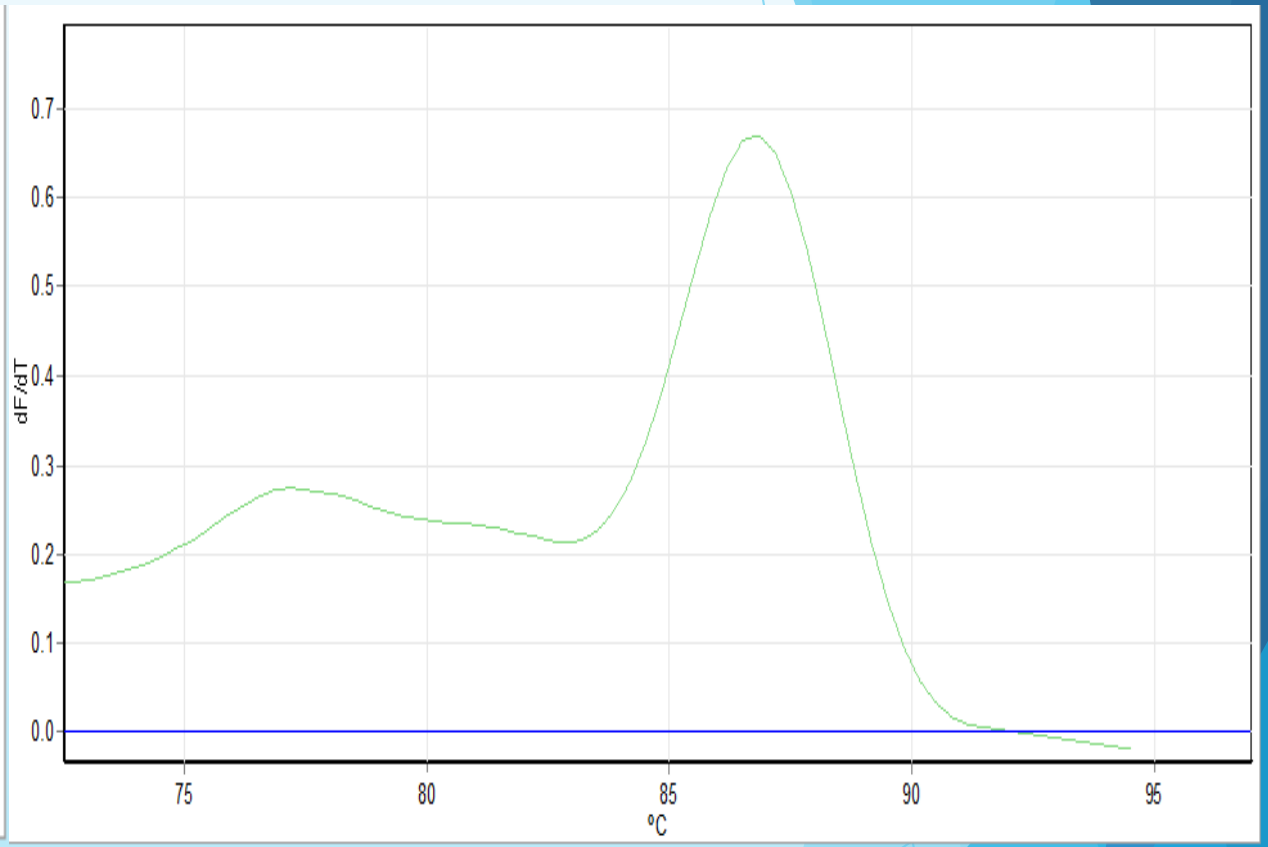


منحنی تکثیرژن *GAPDH*

منحنی ذوب ژن GAPDH

نمودار منحنی ذوب و تکثیر ژنGCK

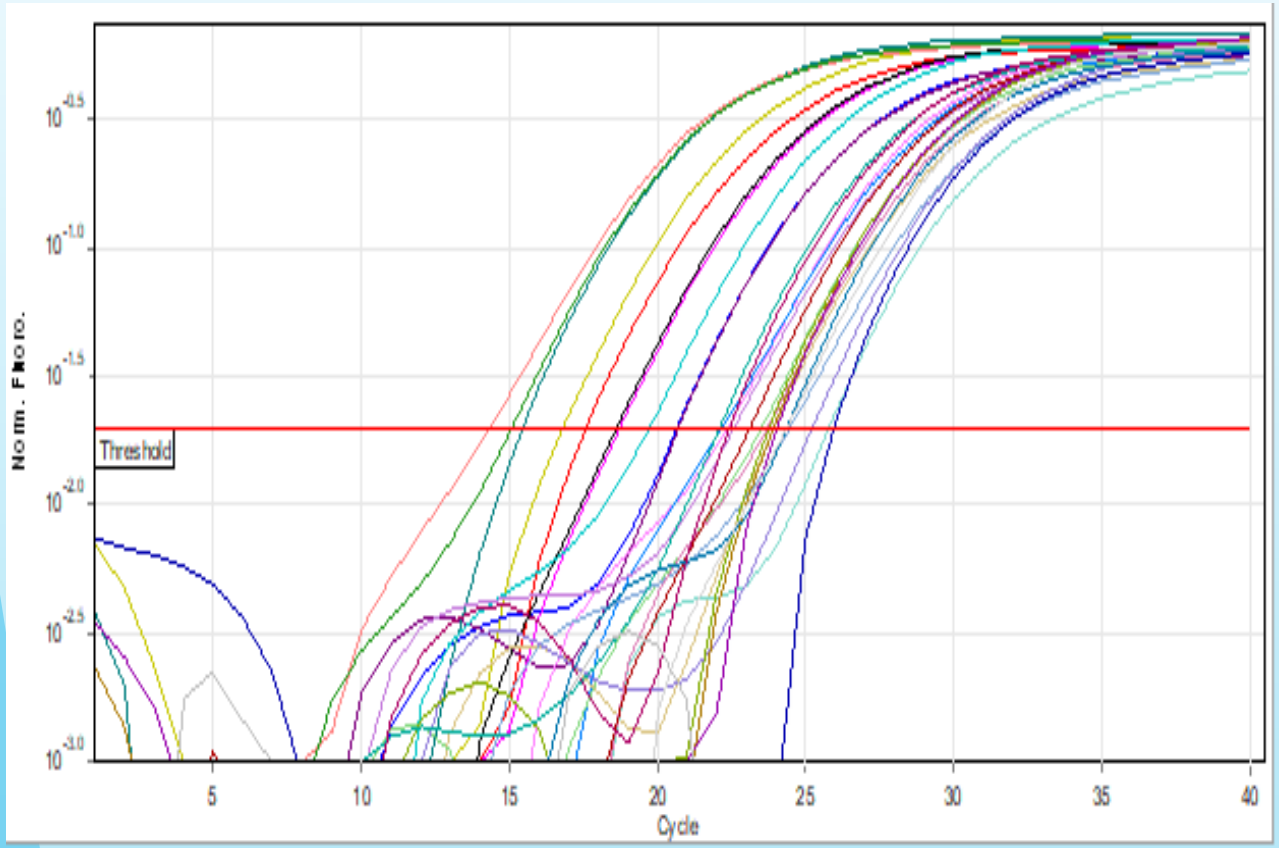


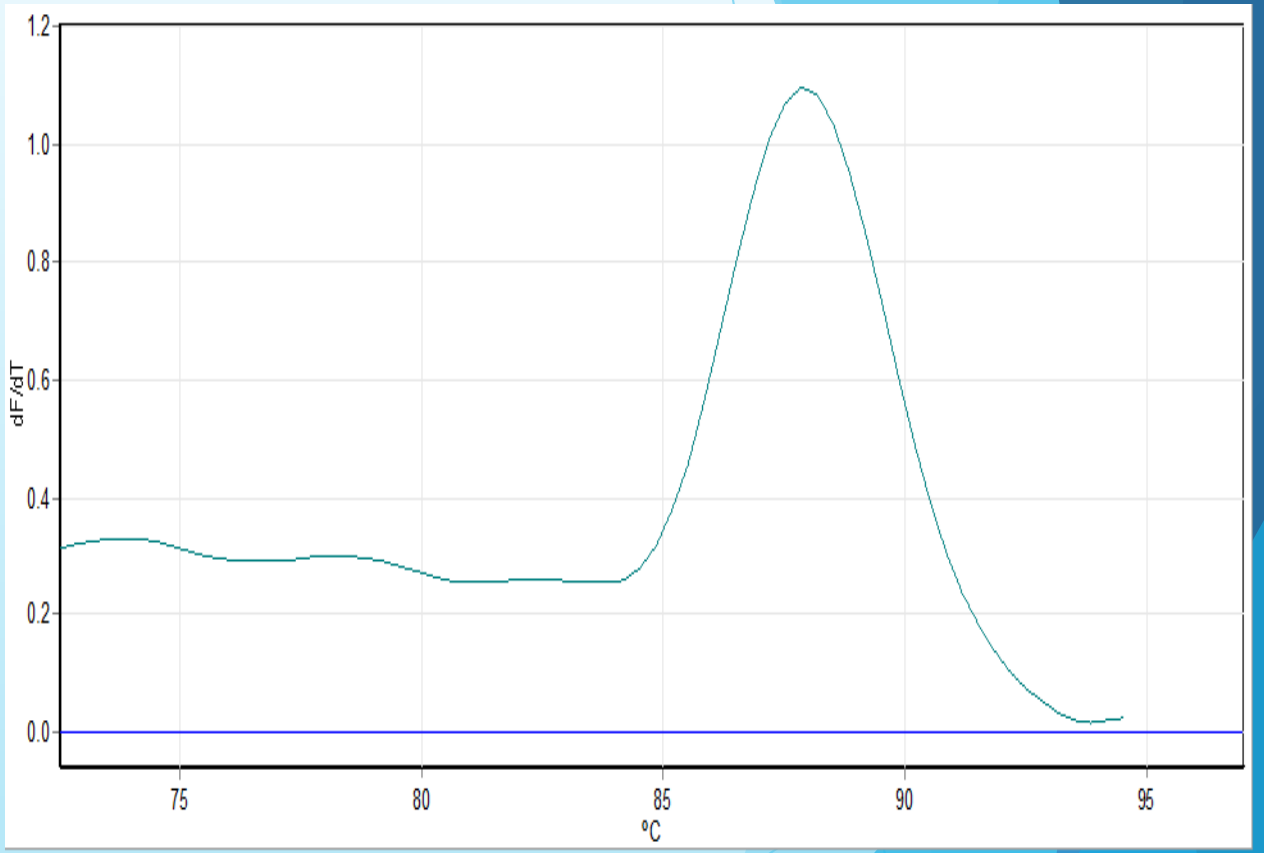


منحنی تکثیر ژن *GCK*

منحنی ذوب ژن GCK

نمودار منحنی ذوب و تکثیر ژنPEPCK





منحنی تکثیر ژن *PEPCK*

منحنی ذوب ژنPEPCK

molecules
MDPI

Review

Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health

Ana Karković Marković, Jelena Torić, Monika Barbarić * and Cvijeta Jakobušić Brala *

Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia; akarkovic@pharma.hr (A.K.M.); jelenatoric@gmail.com (J.T.)

* Correspondence: mbarbaric@pharma.hr (M.B.); cjakobus@pharma.hr (C.J.B.); Tel.: +385-01-6394-472 (M.B.); +385-01-4870-267 (C.J.B.)

Academic Editor: Fátima Paiva-Martins
Received: 30 April 2019; Accepted: 24 May 2019; Published: 24 May 2019

check for updates

Abstract: The Mediterranean diet and olive oil as its quintessential part are almost synonymous with a healthy way of eating and living nowadays. This kind of diet has been highly appreciated and is widely recognized for being associated with many favorable effects, such as reduced incidence of different chronic diseases and prolonged longevity. Although olive oil polyphenols present a minor fraction in the composition of olive oil, they seem to be of great importance when it comes to the health benefits, and interest in their biological and potential therapeutic effects is huge. There is a growing body of in vitro and in vivo studies, as well as intervention-based clinical trials, revealing new aspects of already known and many new, previously unknown activities and health effects of these compounds. This review summarizes recent findings regarding biological activities, metabolism and bioavailability of the major olive oil phenolic compounds—hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein, oleocanthal and oleacein—the most important being their antiatherogenic, cardioprotective, anticancer,

View Article Online
DOI: 10.1039/C7FO00641A

Journal Name

ARTICLE

Tyrosol and its metabolites as antioxidative and anti-inflammatory molecules in human endothelial cells

Francisco J. G. Muriana,*[a] Sergio Montserrat-de la Paz,[a] Ricardo Lucas,[b] Beatriz Bermudez,[c] Sara Jaramillo,[d] Juan C. Morales,[b] Rocio Abia[a] and Sergio Lopez*[a]

Tyrosol and its metabolites as antioxidative and anti-inflammatory molecules in human endothelial cells. Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Tyrosol (Tyr) is a phenolic compound found in virgin olive oil. After ingestion, Tyr undergoes extensive first pass intestinal/hepatic metabolism. However, the knowledge about the biological effects of Tyr metabolites is scarce. We chemically synthesized Tyr glucuronate (Tyr-GLU) and sulphate (Tyr-SUL) metabolites and explored their properties on oxidative stress and inflammation in TNF-α-treated human endothelial cells (hECs). Tyr and Tyr-SUL prevented the rise of reactive oxygen species, the depletion of glutathione, and the down-regulation of glutathione peroxidase 1, glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, and heme oxygenase-1 genes. Tyr-SUL and to a lower extent Tyr and Tyr-GLU prevented the phosphorylation of NF-κB signaling proteins. Tyr-GLU and Tyr-SUL also prevented the over-expression of adhesion molecules at gene, protein, and secretory levels, and the adhesion (Tyr-SUL > Tyr-GLU) of human monocytes to hECs. In vivo, Tyr, and most notably Tyr-SUL in a dose-dependent manner, ameliorated plantar and ear edemas in mice models of acute and chronic inflammation. This study demonstrates antioxidant and/or anti-inflammatory properties for Tyr metabolites, with Tyr-SUL being the most effective.

Introduction

Polyphenols from virgin olive oil have been suggested to be responsible at least for part of the health benefits of virgin olive oil consumption against a range of chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis.[1] Around 80-90% of the total phenol content of

of a potential role for Tyr metabolites in supporting health benefits. Nevertheless, Tyr has been previously shown to inhibit the generation of H_2O_2, to reduce lipid peroxidation products in murine J774A.1 and RAW264.7 macrophages,[7] the phosphorylation of NF-κB in human U-87 glioblastoma cells,[8] the protein expression of ICAM-1 and monocyte adhesion in human endothelial hybrid

Accepted Manuscript

04 July 2017. Downloaded by Cornell University Library on 12/07/2017 09:22:28.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Protective Effect of Tyrosol and S-Adenosylmethionine against Ethanol-Induced Oxidative Stress of Hepg2 Cells Involves Sirtuin 1, P53 and Erk1/2 Signaling

Paola Stiuso *,†, Maria Libera Bagarolo †, Concetta Paola Ilisso, Daniela Vanacore, Elisa Martino, Michele Caraglia, Marina Porcelli and Giovanna Cacciapuoti

Department of Biochemistry, Biophysics, and General Pathology, Second University of Naples, Via L. De Crecchio 7, 80138 Naples, Italy; marialibera.bagarolo@unina2.it (M.L.B.); concettapaola.Ilisso@unina2.it (C.P.I.); daniela.vanacore@unina2.it (D.V.); elisa.martino@unina2.it (E.M.); michele.caraglia@unina2.it (M.C.); marina.porcelli@unina2.it (M.P.); giovanna.cacciapuoti@unina2.it (G.C.)

* Correspondence: paola.stiuso@unina2.it; Tel.: +39-81-566-7629

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Ashok K. Singh

Received: 24 February 2016; Accepted: 12 April 2016; Published: 26 April 2016

دستاوردهای پژوهش

نتیجه گیری

- در این مطالعه تغییرات بیان ژنی ایجاد شده پس از گاواژ تایروزول و تایروزول نیوزومه بر ژنهای مسئول متابولیسم گلوکز بررسی شد؛نتایج حاکی از آن بود که مصرف تایروزول سبب افزایش گلیکولیز و کاهش گلوکونئوژنز کبدی میشود و این تغییرات در چهارچوب تایروزول نانونیوزومه نسبت به تایروزول خالی بسیار محسوس تر است و نزدیکتر به محدوده ی نرمال در گروه کنترل سالم بود که نشان دهنده قابلیت حامل دارویی نانونیوزم بر بهبود ارسال،هدف دهی و اثربخشی تایروزول میباشد.

پیشنهادات

- پیشنهاد میشود که تاثیر تایروزول و تایروزول نانونیوزومه بر متابولیسم کلیوی گلوکز،
- پیشنهاد میشود که میزن بیان Glutها و گیرنده های انسولین وهمچنین برداشت گلوکز خون در بافتهای محیطی پس از مصرف تایروزول و تایروزول نانونیوزومه بررسی شوند.
- پیشنهاد میشود که اثرات تایروزول و نانوتایروزول بر بیان و فعالیت GKRPبررسی شود.
- پیشنهاد میشود که قابلیت این دو ترکیب در بازگرداندن متیلاسیون جزایرcpG و تغییرات اپی ژنتیکی پیشبرنده ی دیابت و یا ایجاد شده توسط دیابت بررسی شود.
- پیشنهاد میشود اثر این دو ترکیب بر ژن SGLT-2 کلیوی بررسی شود که شاید بتواند داروی طبیعی متناوبی برای مهار این ژن باشد.
- پیشنهاد میشود که اثرات تایروزول و نانوتایروزول بر بازسازی کبد و پانکراس در مدل دیابتی بررسی شود.

سپاسگزاری

از لطف بی‌پایان و تلاش دلسوزانه و یاری متعهدانه ی اساتید گرانقدر خانم دکتر مریم ناصرالاسلامی و خانم دکتر فاطمه خاکپای

سپاسگزارم که بدون رهنمودهای شایسته ی ایشان و کمک در گذر از چالشهای پیش آمده در بسیاری از مراحل انجام کار، پیشبرد این پروژه به هیچ وجه قابل انجام نبود و بنده کمال تشکر را از آنها دارم.

سپاس و تقدیر از استاد گرامی خانم دکتر ندا موسوی نیری که با محبت و علاقمندی، با انجام مشاوره و پشتیبانی خود موجبات موفقیت هر چه بیشتر اینجانب در انجام هر چه بهتر این پایان‌نامه را فراهم نمودند.

لازم به ذکر است که تمامی زحمات استادان اینجانب در دوران ملال انگیز کرونا بوده است و بنده کمال تشکر را داشته و امیدوارم بتوانم روزی لطف بزرگشان را جبران کنم.

همچنین لازم می دانم از دو داور گرامی

دکترساری و دکتر جمشیدیان

نیز تقدیر و تشکر نمایم که قبول زحمت کرده و داوری

این پایان نامه را انجام دادند.

ممنون