

**DİYABET MODELİ OLUŞTURULAN INS-1E PANKREAS
BETA HÜCRELERİNDE NEOERİOSİTRİNİN
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF
NEOERIOCITRIN IN INS-1E PANCREATIC BETA CELLS
IN DIABETIC MODEL**

EYMEN ECE ALDEMİR

PROF. DR GÜLDENİZ SELMANOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

08.06.2020

Evrendeki mucizeleri keşfetmeye cesareti olanlara

ve mutluluğu keşfetmemi sağlayan

A. Utku GEZER'e

ÖZET

DİYABET MODELİ OLUŞTURULAN INS-1E PANKREAS BETA HÜCRELERİNDE NEOERİOSİTRİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Eymen Ece ALDEMİR

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

08.06.2020, 71 sayfa

Diyabet günümüzde çok yaygın görülen ve görülme sıklığı giderek artan metabolik bir hastalıktır. Diyabette ilaç kullanımının yanı sıra alternatif olarak bitkisel kökenli antidiyabetik özellik taşıyan ürünler de kullanılmaktadır. Flavonoidlerin çeşitli türlerinin antiinflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik gibi fitoterapötik etkileri bilinmektedir. Pankreas beta hücre hasarı tip-2 diyabet hastalığında önemli bir etkidir. Tip-2 diyabette oluşan hasarın sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte en büyük sebebin oksidatif stres olduğu bildirilmektedir. Flavonoidlerin antioksidan etkileri bilinmekle birlikte neoeriositrin flavonoidi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Neoeriositrin, birçok *Citrus* türünü içeren bazı bitkilerin meyve özütlerinde ve meyve sularında bulunan bir flavonoiddir. Tez çalışmasında streptozotosin (STZ) uygulamasıyla diyabet modeli oluşturulan INS-1E pankreas β hücre hattında neoeriositrinin (0,25 μ M, 0,5 μ M ve 1 μ M konsantrasyonlarda) antioksidan ve antidiyabetik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kristal viyole, tripan mavisi ve akridin oranj/propidyum iyodit hücre canlılık testleri ve oksidatif stres değerlendirmesi için

ROS (reaktif oksijen türleri) ve malondialdehit (MDA) ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca, glukoz miktarına bağlı olarak INS-1E hücrelerinin insülin cevabına neoeriositrinin etkisi de belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak antidiyabetik ve antioksidan etkisi bilinen N-asetil L-sistein (NAC) kullanılmıştır. Sonuç olarak neoeriositrinin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer yandan neoeriositrinin konsantrasyonuna bağlı olarak MDA ve ROS miktarlarını azalttığı tespit edilmiştir. Glukoz uyarımlı insülin testi sonuçlarımız, neoeriositrinin glukoz miktarına bağlı olarak INS-1E hücrelerinin insülin cevabında bir artışa neden olduğunu göstermiştir, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak, çalışmadan elde edilen bulgularımız neoeriositrinin pankreas beta hücrelerindeki oksidatif hasara karşı koruyucu olabileceği ve diyabet için yeni bir aday ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet modelleme, flavonoid, koruyucu etki, neoeriositrin, oksidatif stres, INS-1E pankreatik beta hücre hattı

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF NEOERICITRIN IN INS-1E PANCREATIC BETA CELLS IN DIABETIC MODEL

EYMEN ECE ALDEMİR

Master of Biology, Department of Zoologia

Supervisor: Prof. Dr. GÜLDENİZ SELMANOĞLU

08.06.2020, 71 pages

Diabetes is a very common metabolic disease and its incidence has been increasing. In addition to use of drugs in diabetes treatment, plant-based antidiabetic products are also used as alternative. Phytotherapeutic effects of various types of flavonoids such as anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic, etc. are known. Pancreatic beta cell damage is an important factor in that leads to type 2 diabetes. In type-2 diabetes, the cause of the damage is not known exactly, it is asserted that it is mainly because of oxidative stress. Although antioxidant effects of flavonoids are well known, there is not much information enough about neoericitrin flavonoid. Neoericitrin is a flavonoid, which found in fruit extracts and fruit juices of some plants containing many Citrus species. In this study, antioxidant and antidiabetic effects of neoericitrin (0,25 μ M, 0,5 μ M ve 1 μ M concentrations) were examined in INS-1E pancreas β cell line by exposing to streptozotocin (STZ) in diabetic model. In this study, cell viability were examined by crystal violet, trypan blue and acridine orange/propidium iodide analyses; while

oxidative stress were analysed by reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) measurements. Also, the effect of neoeriocitrin to insulin response of INS-1E cells according to glucose level in media has been determined. N-acetyl L-cysteine (NAC), known as antidiabetic and antioxidant, has been used as a positive control. Cell viability analyses showed that neoeriocitrin increased the cell viability in a concentration-dependent manner. On the other hand, according to results of oxidative stress test, neoeriocitrin decreased the ROS and MDA levels depending on the concentration. Our insulin test results showed that neoeriocitrin caused increase in insulin response of the INS-1E cells according to the glucose amount. As a conclusion, our findings suggest that neoeriocitrin could protect oxidative damage in pancreatic beta cells and might be as a novel agent for diabetes.

Keywords: Diabetic model, flavonoid, protective effect, neoeriocitrin, oxidative stress, INS-1E pancreatic beta cell line

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU'na bana tezimle ilgili her zaman destek olduğu, yüksek lisans yapmam için bana imkan sağladığı ve yönlendirdiği için teşekkür ederim.

Dr. Elif KARACAOĞLU'nun deney süresince bana bilgilerini paylaşmakla kalmayıp deneyimlerini de aktardığı için benim için her zaman yeri ayrı olacaktır kendisine sonsuz teşekkür ederim. Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'nun bana öğrettiği hem hayata dair hem bilime dair bilgiler için bir hocadan fazlasıydı.

Prof. Dr. E. Arzu KOÇKAYA benim için manevi olarak çok değerli olan ve zor zamanlarımda bana destek olduğu için bu çalışmamın sürdürmemde bana katkılarından dolayı minnet duyuyorum.

Tez çalışmamı gerçekleştirmemde, FBA-2018-16746 nolu proje ile finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığımız INS-1E hücre hattını temin etmemizi sağlayan P. MAEHLER ve ekibine teşekkür ederim.

Benden önceki dönemlerde yüksek lisans tezlerini yaparken bana öğrettikleri bilgiler ışığında bu tezi yapmamda katkısı olan Eylül TURASAN, Elnaz YOUSEFİ, Özge Nur KANAT'a destekleri için teşekkür ederim.

Arkadaşlığı ve laboratuvarında her zaman yanımda olan Selen SANİN tezimin başından sonuna benle geçirdiği süre boyunca her türlü destek çıkması, benim bu tezi bitirmemde yardımından dolayı teşekkür ederim.

Annem Oya ALDEMİR, babam Hakan ALDEMİR, kardeşim Eymir Ege ALDEMİR'e, Gönül ALDEMİR'e ve GEZER ailesine beni her konuda destekledikleri ve yüksek lisansım boyunca yanımda oldukları için teşekkür ederim.

A. Utku GEZER'e bana olan inancı ve yapabileceğime dair umudunu hiç kaybetmediği için ona sonsuz teşekkür ediyorum.

Merve SAYIN ve Melek ASLAN tezi yazarken benimle konuşarak bitirmem için güç verdiğiniz ve her zaman yanımda olduğunuz için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Diyabet Hastalığı.....	3
2.2. Diyabet Çeşitleri ve Nedenleri	4
2.3. Pankreatik Beta Hücrelerinde İnsülin Salgılaması Mekanizması	5
2.4. Tip-2 Diyabette β -Hücrelerinin Hasar Nedenleri.....	6
2.5. Oksidatif Stres	7
2.6. INS-1E Hücre Hattı.....	10
2.7. Streptozotosinin Pankreatik β -Hücrelerinde Etkisi	11
2.8. Diyabette Bitkisel Kaynaklar	12
2.9. Flavonoidlerin Antioksidan Özellikleri ve Diyabete Etkisi	15
2.10. Apoptoz ve Nekroz.....	18
2.11. Hücre Canlılık Testleri	20
2.11.1. Kristal Viyole Canlılık Testi	20
2.11.2. Tripan Mavisi Canlılık Testi	20
2.11.3. Akridin Oranj (AO)/ Propidyum İyodit (PI) Boyama	20
2.12. Glukoz Uyarımlı İnsülin Miktar Tayini	21
2.13. Oksidatif Stres Testleri.....	21
2.14. İstatistik Analizler	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	24
3.1. Kimyasal Malzemeler	24
3.2. INS-1E Hücre Hattı ve Kültüre Edilmesi.....	24

3.3. Hücre İkileme Zamanının Belirlenmesi.....	25
3.4. Streptozotosin, Neeriositrin ve NAC Ana Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	26
3.5. Deney Planı.....	27
3.6. Kristal Viyole Hücre Canlılık Testi.....	27
3.7. Tripan Mavisi Boyama.....	29
3.8. Akridin Oranj/ Propidyum İyodit Boyama.....	29
3.9. Glukoz Uyarımlı İnsülin Miktar Ölçüm Testi.....	30
3.10. Oksidatif Stres Ölçümü.....	31
3.11. Protein Tayini.....	33
4. SONUÇLAR.....	34
4.1. Hücre İkileme Sonuçları.....	34
4.2. Streptozotosin ile Diyabet Modellemesi.....	36
4.3. Kristal Viyole Hücre Canlılık Test Sonuçları.....	37
4.4. Tripan Mavisi ile Canlılık Test Sonuçları.....	39
4.5. Akridin Oranj/Propidyum İyodit Test Sonuçları.....	40
4.6. Glukoz Uyarımlı İnsülin Miktar Ölçümü Sonuçları.....	44
4.7. Oksidatif Stres Ölçümü Test Sonuçları.....	45
5. TARTIŞMA.....	49
6. YORUM.....	55
7. KAYNAKLAR.....	57
Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücre içi oksidan-antioksidan dengesi [26]	8
Şekil 2.2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	9
Şekil 2.3. Streptozotosinin pankreas beta hücrelerine etkisi [48].....	12
Şekil 2.4. Neoeriositrinin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.5. Flavonoidlerin pankreas üzerindeki etkileri [60]	15
Şekil 2.6. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar [77].....	19
Şekil 2.7. DCFHDA boyama yöntemi [83].....	22
Şekil 2.8. Lipid peroksidasyon testi [26].....	23
Şekil 4.1. INS-1E hücrelerinin üreme eğrisi	34
Şekil 4.2. INS-1E hücrelerinin 11. gün görüntüsü	35
Şekil 4.3. INS-1E hücrelerinde kristal viyole testi ile hücre canlılık sonuçları. a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık	36
Şekil 4.4. INS-1E pankreas hücrelerinde neoeriositrinin farklı konsantrasyonlarının kristal viyole testi ile hücre canlılık sonuçları. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel fark	38
Şekil 4.5. INS-1E pankreas hücrelerinde tripan mavisi boyama testi ile hücre canlılık sonuçları	39
Şekil 4.6. INS-1E hücrelerinde AO/PI floresan boyama testi ile hücre canlılık sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark, b: STZ grubu ile arasında anlamlı bir fark	40
Şekil 4.7. INS-1E hücrelerinin floresan mikroskopunda AO/PI floresan boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: STZ, C: NAC+STZ, D: 0,25 µM Neo+STZ, E: 0,5 µM Neo+STZ, F: 1 µM Neo+STZ	42
Şekil 4.8. INS-1E hücrelerinde glukoz miktarına göre hücrelerin salgıladığı insülin miktarları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: STZ grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). c: NAC grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).	44
Şekil 4.9. INS-1E hücrelerinde lipid peroksidasyon ölçümü	45
Şekil 4.10. INS-1E pankreas hücrelerinde hücre içi ROS ölçüm sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark. b: 50 µM hidrojen peroksit grubu ile arasında anlamlı bir fark.	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C°	Santigrat derece
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
LC ₅₀	Letal konsantrasyon 50
CO ₂	Karbondioksit

Kısaltmalar

Neo	Neoeriositrin
STZ	Streptozotosin
NAC	N-asetil L-sistein
ROS	Reaktif oksijen türleri
DMSO	Dimetil sülfoksit
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 üretilen besiyeri
OD	Optik dansite
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
GTP	Guanozin 3-fosfat
ATP	Adenozin 3-fosfat
GSIS	Glukoz uyarımlı insülin salımı
O ⁻²	Süperoksit anyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH ⁻	Hidroksil radikali

Kv	Potasyum kanalları
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
K ⁺	Potasyum iyonu
GLP-1	Glukagon benzeri peptid-1
GLUT-2	Glukoz taşıyıcı 2
SOD	Süperoksit dismutaz enzimi
CAT	Katalaz enzimi
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz enzimi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
AChE	Asetilkolinesteraz

1. GİRİŞ

Tip-2 diyabet çağımızın en önemli ve en yaygın hastalıklarından biridir. Özellikle günümüzde insanların yaşam kalitesini azaltan ve farklı diğer hastalıklarla ilişkisi olan kompleks bir hastalıktır. Tip-2 diyabet hastası insanların diyabete bağlı başka hastalıklara da sahip olabildiği belirlenmiştir. Özellikle bu hastalıkların başında obezite diyabet birlikte anılmaktadır [1]. Vücuttaki yağ oranının artmasıyla birlikte tip-2 diyabet hastalığı da aynı oranda artış göstermektedir. Vücuttaki yağ oranının artmasıyla birlikte obezite hastalığının diyabet hastalığını tetiklemesi ile yeni bir terim olan “diabesity” ortaya çıkmıştır. Tip-2 diyabet hastalığının ilerlemesi sonucunda kardiyovasküler hastalıklar, nefropati ve körlük gibi komplikasyonlar hastalıkla birlikte gelişebilmekte veya bu hastalıkları bulunan insanlarda zaten tip-2 diyabet tespit edilmektedir [2]. Tip-2 diyabet hastalığının değerlendirildiği 1980 yılından 2014 yılına kadar yapılan çalışmada 108 milyon kişi diyabet hastasıyken 2014 yılında bu sayı 422 milyon diyabet hastası olarak tespit edilmiştir. Diyabet hastalığı kişinin yaşam kalitesini düşürmekle kalmayıp insanlar ilaçların maliyetine karşı ekonomik zorluk yaşamaktadır [3]. Tip-2 diyabet çok yönlü bir hastalık olup tedavisi için ilaçlar yetersiz kalmaktadır ve ilaç tedavilerinin yetersizliğinde alternatif yöntem arayışlarına gidilmektedir. Alternatif arayışlardan biri bitkisel kaynaklı çözümlerdir ve ilaçların oluşturduğu yan etkiler olmaksızın diyabet hastalığının tedavisinde ek bir yöntem olarak gösterilmiştir [4,5] Pankreas insülin ve glukagon hormonlarını salgılayan önemli bir endokrin organ olmakla birlikte vücudun metabolizmasına önemli bir katkısı bulunmaktadır. Diyabet hastalığında bu salgıların düzeninin bozulması veya pankreas hücrelerinin hasara uğrayıp endokrin hormonların salgılanmaması söz konusudur. Diyabet hastalığının sebeplerinden biri olan oksidatif stres, pankreas hücre hasarına yol açmakta ve bu şekilde diyabet hastalığına zemin oluşturmaktadır. Çeşitli flavonoidlerin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda pankreası koruyucu ve insülin salımını artırıcı özellikleri ortaya koyulmuştur [6,7].

Tez kapsamında yapılan çalışmada, sıçan pankreas beta hücre hattı olan INS-1E hücreleri kullanılarak streptozotosin ile oluşturulan diyabetik modelde oksidatif strese karşı bir flavonoid olan neoeriositrinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Diyabet hastalığında önemli bir etken olan düşük ve yüksek glukoz uyarımıyla pankreatik beta hücrelerinden insülin salımı ölçülmüştür.

Ayrıca neoeriositrinin koruyucu etkisi kristal viyole, tripan mavisi boyama ve akridin oranj/propodyum iyodid hücre canlılık testleri, oksidatif stres belirteci ROS ölçümü ve lipid peroksidasyon belirteci MDA ölçümü yapılarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet Hastalığı

Çağımızda diyabet hastası olan insanların sayılarının gün geçtikçe artması öngörülmektedir. Uzun zamandan beri bilinen bu hastalıkta özellikle ülkelerin ekonomik ve kültürel yapıları da önemli bir rol oynamaktadır. Yaş ve cinsiyet de parametreler arasında olup değerlendirmeler buna göre yapılmaktadır [8]. Yıllardır tip-1 diyabetin sebebinin insülin salgılanmaması olduğu bilinmekteydi. Tip-2 diyabet genellikle insülin direnci olarak bilinmekteydi. 1960'lı yıllarda tip-2 diyabet hastalarında pankreastan salgılanan insülin miktarındaki değişmelerle bu yargı ortadan kalkmıştır [9]. Bu yüzyılda teknolojinin gelişmesi ile beslenmedeki düzensizlik ve hareketsizlik nedeniyle diyabet hastası olan insanların sayısı katlanarak artmaktadır. İnsanlar uzun süredir diyabet hastalığına tedavi arayışı içindedir.

Bilimsel olarak *Diabetes mellitus* olarak tanımlanan diyabet, pankreas beta hücrelerinin insülin salımında ve/veya insülinin diğer organlar tarafından alınmasının engellenmesi ile oluşan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Hiperglisemi ise kandaki glukoz miktarının yüksek seviyede olmasıyla tanımlanır. Kronik olarak görülen hiperglisemi de çeşitli organlarda uzun süreli hasarlar ve fonksiyonlarında bozukluğa sebep olabilirken özellikle göz, vasküler sistem, nöronlar ve kalp olumsuz etkilenir. Diyabetin birçok sebebi olabilir ve otoimmün sebepli beta hücrelerinin hasara uğraması sonucu insülin salımı azalır ve doku hücreleri yeterli insülin alamadığı için çeşitli komplikasyonlara yol açar. İnsülin yeteri kadar hedef organlar tarafından alınmadığı zaman protein, karbohidrat, yağ metabolizmalarında ve çeşitli hormonların düzenlenmesinde problemler yaşanmaktadır. Diyabetin akut etkisi ketoasidosis ve ketotik olmayan hiperosmolar sendromdur. Diyabetin uzun süreli etkisi olarak görme bozuklukları, retinopati, nöral bozukluklardan kaynaklı nöropati, ayak ülseri, damar sisteminde bozukluklar ve cinsel bozukluklar görülür. Diyabetle birlikte insanlarda hipertansiyon sıklığının arttığı tespit edilmiştir [10,11].

2.2. Diyabet Çeşitleri ve Nedenleri

Diabetes mellitus temelde tip-1 ve tip-2 diyabet olarak ikiye ayrılır. Tip-1 diyabet genetik etkenli olarak bilinir. Tip-2 diyabete göre daha az sıklıkta görülmektedir. Tip-1 diyabet, vücudun kendi otoimmün sisteminin pankreastaki adacık hücrelerine saldırarak yok etmesiyle ortaya çıkar. Bu olay makrofaj ve T hücreleri ile veya dolaylı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ile gerçekleşmektedir [10,12]. Literatürde Tip-1 diyabet insüline bağımlı diyabet olarak geçmektedir. Tip-1 diyabetin oluşmasında genetik yatkınlık kadar çevresel faktörlerin de etkili olduğu gösterilmiştir [13].

Tip-1 diyabet hastalığına neden olan çevresel etkiler; virütik, D vitamini eksikliği, ultraviyole ışınları gibi etkenler söz konusudur. Vücuttaki bağışık sistemi makrofajları ve T hücreleri bazı sitokinleri üretir. İnterlökin-22 (IL-22), interferon-a (IFN-a) ve tümör nekroz faktörü-b (TNFb) gibi faktörler tip-1 diyabetin gelişmesine neden olabilir. Sitokinler tarafından apoptotik süreç tetiklenir. Bu yollarla pankreastaki hücrelerde geri dönüşümü olmayan hasarlar oluşur ve beta hücrelerinden insülin salımının azalmasına bağlı olarak kan şekeri değerleri yüksek seviyede seyrederek. Bu durumda vücuttaki şeker depolanamaz ve ihtiyaç halinde kullanılamaz duruma gelir [14,15].

Tip-2 diyabet tek yönlü bir hastalıktan ziyade çok yönlü bir hastalıktır. Çeşitli çalışmalarla tip-2 diyabetin obezite ve insülin direnci ile bağlantılı olduğu ortaya koyulmuştur. Kişilerin yaşam şekillerine bağlı olarak insülin direncinin duyarlılığında düzenli egzersiz, beslenme alışkanlıkları büyük bir etkindir. Tip-2 diyabet başlangıçta insülin direnci ile başlayıp beta hücrelerinin kaybıyla sonuçlanır. İnsülin direnci kas, karaciğer ve yağ dokularının yeterli miktarda insülin alamaması ve insüline duyarsızlaşmasıyla tanımlanabilir. Tip-1 ve tip-2 diyabet temelde pankreas beta hücrelerinin zarar görmesiyle sonuçlanır. Yalnızca hastalığa neden olan sebepler farklıdır. Tip-1 diyabet genetik olarak immün sistemden kaynaklanan bir problemden oluşurken, tip-2 diyabet genetik yatkınlıkla beraber beslenme, hareketsizlik, stres gibi sebeplerle meydana gelir [16].

Normalde kanda bulunan glukoz ile insülin salgılanması karşılıklı cevap veren bir sistemdir. Pankreas beta hücreleri glukozu karşı oldukça duyarlıdır. İnsülin yalnızca glukoz varlığında salgılanmaz, aynı zamanda pankreas beta hücreleri amino asitlere ve yağ asitlerine de duyarlı olduğu için onlara karşı bir yanıt da verebilir. Yine de baskın olarak insülin yanıtı sağlayan glukozdur. Glukozun oral olarak alımı bile birkaç dakika

içerisinde pankreas beta hücrelerinde insülin salımını arttırır. Tespit edilen pankreas beta hücrelerinin hasarı sonrası erken belirtilerden birisi insülin salgısının düzensizliği, glukozu verdiği cevaptaki farklılıklar ve glukoz-insülin bağlanmasının bozulması yer almaktadır ve insülin direnci oluşmaktadır [17]. Glukozun sürekli olarak vücutta birikmesi zarar verir. Bu durum glukotoksisite olarak adlandırılır. Birçok organa zarar vermekle birlikte glukotoksisite diyabet hastalığı için en önemli organ olan pankreasa zarar verir [6,18].

Hiperglisemi, tip-2 diyabette sürekli olması halinde diğer organlardaki yan etkileri hariç pankreastaki insülin salgımından sorumlu beta hücrelerini de tahrip etmekte ve kişide bu insülin yetersizliğine bağlı olarak vücutta gereğinden fazla miktarda glukozun kalmasıyla glikotoksisite oluşturmaktadır [16]. Sağlıklı insanlarda glukoz, pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanması için bir tetikleyici görevi görmektedir. Glukozun hücre içine alınması GLUT-2 taşıyıcı proteiniyle gerçekleşir ve hücre içi-dışı glukoz homeostazın korunmasını sağlar. Glukoz metabolizmasında ATP miktarının homeostazisi de hücre içinde veya dışında çok önemlidir [17].

2.3. Pankreatik Beta Hücrelerinde İnsülin Salgılama Mekanizması

Sağlıklı bir bireyde pankreatik beta hücrelerinin glukoz ile uyarılmasıyla insülin salgılanması gerçekleşir. Ancak uyarı olmadan sürekli insülin salgılanması, insülin metabolizmasının düzenlendiği yolakta bir sorun olduğunu gösterir. Sağlıklı insanlarda pankreas beta hücrelerinde salgı granülleri içinde insülin proinsülin halinde bulunmaktadır. Proinsülin gelen uyarımla birlikte insüline ve C peptite ayrılır. Diyabet hastalığında ise proinsülinin insüline dönüşümü de engellenmektedir. Bu nedenle proinsülinin parçalanması tamamlanmadığı için salgılanırken proinsülin ve insülin olmak üzere iki ayrı protein olarak pankreastan salgılanır. Yapılan klinik araştırmalarda tip-2 diyabet hastalarında proinsülin miktarında %8 artış saptanmıştır [19]. Tip-2 diyabetin oluşmasındaki esas sorun pankreatik beta hücrelerin zarar görmesi ve insülin salgımındaki azalmadır. Hipergliseminin ortaya çıkmasıyla birlikte pankreas beta hücrelerinde kütleli azalma başlar. Obez olan hastaların çoğunda insülin direnci görülmektedir. Geri kalan kısmında ise tip-2 diyabet hastalığı da görülebilmektedir. Glukoz uyarımlı insülin salımı (GSIS) diyabet hastalarında düşük seviyede

seyretmektedir. Pankreas beta hücrelerindeki fonksiyon azalması ve kütle azalmasına bağlı olarak diyabet hastalığı görülebilmektedir [20].

Tüm memelilerde beslenme sonrası, insülin salımı hızlı ve yüksek oranda gerçekleşir. Başlıca etken glukoz olmasına rağmen onun yanında serbest yağ asitleri, amino asitler ve bazı regülatörler de dahil olmak üzere insülin salımının uyarılmasında yardımcı etkenler gerekmektedir. Besinler sindirilip emilirken kalın bağırsaktaki enteroendokrin hücreleri (L hücreleri) uyarılır. Bu uyarımla birlikte glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve gastrointestinal inhibitör polipeptidi (GIP) insülin salımını sağlayan proteinlerdir. Metabolik olarak pankreatik beta hücrelerinden insülin salgılanması için uyarı gerekir. Temelde mitokondride glukoz metabolizmasında meydana gelen bir dizi etkileşim gerçekleşir. Beta hücrelerinde 3 tane iyon kanalı vardır. Bunlar: K^+ kanalı, voltaj kapılı Ca^{+2} kanalı ve kalsiyum kanalı (Kv)'dır. Glukoz uyarımıyla birlikte Kv kanalı repolarize olur ve Ca^{+2} kanalı ile Ca^{+2} iyon geçişi durduğu öne sürülmektedir. Kv kanalı hücreye giren glukoz miktarına göre insülin salgılanmasını belirleyen önemli bir homeostatik görev yapmaktadır. Membran potansiyeli değiştiğinde K^+ kanalı kapanır ve voltaj kapılı Ca^{+2} kanalının açılmasıyla hücre içerisine Ca^{+2} girişiyle birlikte insülin salımı gerçekleşir. Glukozun artışı ile ATP/ADP oranının artmasıyla glukoz, glikoliz ile piruvata parçalanır ve piruvat oksidatif giriş yolu olan piruvat dehidrogenaz veya piruvat karboksilaz yolu ile mitokondrideki krebs döngüsüne girer. Krebs döngüsünden izositrat ve sitrat, sitrat-izositrat taşıyıcı ile sitozole geçer. Sitozolda sitrat izositrata çevrilir. Son olarak da izositrat NADPH ile α -ketogluterata çevrilir. GTP, NADPH ve α -ketogluterat insülinin salınmasında tetikleyici faktördür ve GSIS'i sağlar [20–22].

2.4. Tip-2 Diyabette β -Hücrelerinin Hasar Nedenleri

Tip-2 diyabetin altında yatan nedenlerden en önemlileri;

- 1) İnsülin direnci
- 2) β -hücrel fonksiyonların bozulması

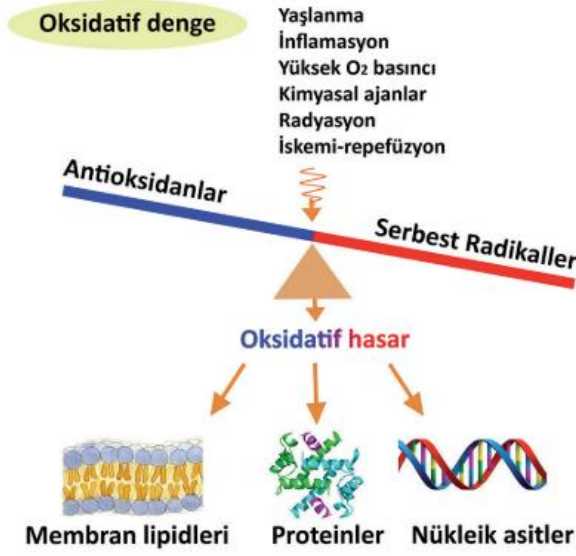
Bu nedenlerin altında yatan bireysel duyarlılık, çevresel ve genetik etkenler gibi değiştirici faktörler olmasına rağmen insülin direnci ve pankreas β -hücrelerinin

fonksiyon bozukluğu görülen en temel nedenlerdir. Aşırı beslenme ve obeziteyle ortaya çıkan insülin direnci, kronik inflamasyon, genetik duyarlılık ve metabolik zorlanmalar pankreas beta hücrelerinde olumsuz değişiklikler yapar. Pankreas beta hücreleri sayısının azalması ve fonksiyon bozukluğu tip-2 diyabet belirtileridir. Pankreas beta hücrelerindeki kütle kaybı ve fonksiyon bozukluğunun sebepleri; inflamatuvar stres, endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres, amiloid stres ve pankreas adacıklarının bütünlüğünü koruyamamasıdır [23].

Bozulmuş karbohidrat metabolizması ve gelişmekte olan insülin direnci, hiperglisemiye yol açan insüline bağımlı diabetes mellitus'un ana sebeplerindendir. Karbohidratların sindirim ve absorpsiyonunda bozulma, glikojen depolarının tükenmesi, artan glikoneogenezis, β -hücresi disfonksiyonu, periferik dokunun insülin direnci ve insülin sinyal yollarındaki hatalar hipergliseminin önemli nedenleridir [24].

2.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, metabolizmadaki antioksidan ve oksidan dengesinin bozulmasıyla ortaya çıkan ve pek çok hastalığa ve doku hasarına sebep olan en önemli etkenlerden biridir [25]. Hücreiçi antioksidan ve oksidan metabolizması dengede olduğu sürece oksidatif stres oluşmaz. Ancak antioksidanların azalması ile hücrede apoptoz veya nekroz yolaklı ölüme neden olurlar. Oksidatif stresin oluşmasının altında pek çok sebep yatar. Bu sebepler çevresel kaynaklı ve metabolizma kaynaklı olabilir. Çevresel faktörler olarak radyasyon, sigara, endüstriyel atık sular, kimyasallar gibi pek çok faktör etki eder. Metabolik olarak karbohidrat, yağ ve protein yıkımında da açığa çıkabilirler. Sonuç olarak reaktif oksijen türleri metabolizmanın doğal olarak ürettiği atıklar olup denge bozulursa (Şekil 2.1.) oksidatif stres durumu ortaya çıkar [26,27].



Şekil 2.1. Hücre içi oksidan-antioksidan dengesi [26]

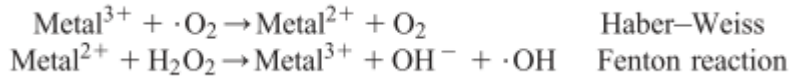
Serbest radikaller, atom veya moleküllerin son yörüngelerinde eşleşmemiş elektronlarının bulunduğu formlardır. Stabil durumda olmadıkları için diğer eşleşmiş atomlardan elektron koparma eğilimindedirler. Elektron koparmasıyla birlikte diğer atom ve moleküllerin yapısı bozulmaya başlar. Mitokondrideki oksidasyonla birlikte serbest radikaller oluşarak çeşitli makro ve mikro moleküllere zarar verir.

Başlıca serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri olarak iki çeşittir. Aerobik solunum yapan bütün canlılarda oksijenin kullanılması sonucu elektron taşıma sisteminde serbest oksijenin su ve ATP'ye dönüştürülmesinden arta kalan çok az bir kısmı hücre içerisinde ROS'ni oluşturur. Bu durum hücre içi savunma sistemi olarak başlamasına rağmen antioksidan metabolizmasının bozulmasıyla birlikte hücreye zarar vermektedir. Serbest radikaller ilk önce hücre içinde meydana gelmeye başlar ve daha sonra devam eden zincir reaksiyonlarla tekrar tekrar oluşarak bir döngü ve süreklilik sonucu serbest radikaller ortaya çıkar [27,28].

Hücrede belirli bir dengede tutulan reaktif oksijen türleri homeostazisin bozulmasıyla hücrede oksidatif stres oluşturur. Bu durumda serbest oksijen lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın yapısını bozarak kendini eşlemeye çalışır. ROS'nin başlıca en önemlileri: Süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^*)'dir [29,30].

Reaktif oksijen türlerinin oluşmasın da endojen kaynaklı ve ekzojen kaynaklı olarak iki grupta toplayabiliriz. Ekzojen kaynaklı olarak sigara, ağır metal iyonları ROS

oluşumuna neden olabilir. Endojen kaynaklı olarak Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu olarak iki şekilde gerçekleşir. Haber-Weiss reaksiyonunda demir (Fe^{+3}) iyonlarının süperoksit anyonu ile indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Fenton reaksiyonunda Fe^{+2} iyonunun yükseltgenmesi ile hidroksil iyonu oluşur (Şekil 2.2.) [30–32].



Şekil 2.2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

Endojen kaynaklı reaktif oksijen türleri hücrenin kendi metabolizması tarafından oluşturulur. Solunum yoluyla alınan oksijenin mitokondriyal elektron taşıma sisteminde sitokrom oksidaz tarafından su molekülüne çevrilirken serbest oksijen, süperoksit anyonu olarak mitokondrideki krebs döngüsünde NADPH ile reaksiyona girer. Süperoksit anyonu hidrojen peroksite katalizlenir. Protein, lipid ve DNA yapısını bozan en önemli reaktif oksijen türü olan hidroksil anyonudur [32].

Kandaki şeker miktarının normal seviyesinden fazla olmasına bağlı olarak glukoz toksisitenin oluşmasıyla birlikte oksidatif stres oluşumunu desteklediği patolojik yönden kanıtlanmıştır [33]. Oksidatif stres çeşitli koşullarda ortaya çıkarak farklı şekillerde hücre hasara neden olur. Hücre içerisinde gerçekleşen oksidatif stres, temelde pankreas β hücrelerinde iki farklı hasara neden olur. Hücre DNA'sını hasara uğratabilir veya endoplazmik retikulumda Ca^{+2} seviyesi azalması ile etki mekanizmasını gösterir [34].

Tip-2 diyabetli bireylerde yapılan çalışmaların sonucunda pankreas β hücrelerinde kütleli bir azalma görülmesinin apoptozun artmasına bağlı olduğu bildirilmiştir. Obezite hastalarında yapılan çalışmalarda özellikle pankreas β hücrelerinin sayısal olarak azaldığı tespit edilmiştir. Açlık kan şekeri yüksek olan hastalarda β -hücre kütlelerinin %50 azaldığı, tip-2 diyabetli hastalarda ise %63 oranında bir azalma saptanmıştır [35]. Diyabet hastalığının sebeplerinin ortaya çıkarılması için öncelikle hücre düzeyinde mekanizmanın açıklığa kavuşturulması gereklidir. Yapılan çalışmalarda, insanlardan alınan pankreas β hücrelerinin *in vitro* koşullarda glukagon

benzeri peptid-1 (GLP-1) varlığında ve yokluğunda yapılan testlerde en etkili faktör GLP-1 olarak tespit edilmiştir [36].

Hücrelerde oksijenli solunum ile mitokondride açığa çıkan hidrojen peroksit ve serbest oksijen hücrenin kendini savunma mekanizmalarından biri olarak görev yapmaktadır. Ancak hücrede bu denge bozulduğunda oksidatif stres hücreyi ölüme götürmektedir. Özellikle bu dengeyi sağlayan enzim sistemi de bulunmaktadır. Oksidatif stresi önleyen enzimlere antioksidan enzimler adı verilir. Özellikle pankreas yapısı gereği oksidatif strese daha duyarlı ve daha hassastır. Hiperglisemi özellikle oksidatif stres pankreasta hasar verici boyutlara ulaşır. Kandaki yüksek glukoz oksidatif stres oluşumunu tetikler. Pankreas β hücreleri glukozun artışına bağlı olarak yüksek miktarda insülin GLUT-2 ile taşınır. Antioksidan enzimlerin yetersiz ifade olması hücrede oksidatif stres oluşturur. Pankreas β hücrelerinde birçok ROS oluşum yolu vardır [37].

Bunlardan en etkili olanları:

- Mitokondri elektron taşıma sistemi [38]
- Hekzoaminaz yolu [39]
- Glikolizasyon yolu

Bu yollar içerisinde en fazla oksidatif stres oluşumu glikolizasyonda görülmektedir.

Normal durumda glukoz ilk önce glikoliz ve oksidatif fosforilizasyon döngüsüne girer. Ancak diyabet hastası olan kişilerde glukozun gliseraldehit oluşumu engellenir. Glikolizasyon yolunda gliseraldehit-3fosfat glikasyonu sırasında ROS oluşumuna neden olur. Fruktoz-1:6-bis-fosfatın glukozamine dönüşmesi ile hekzoaminaz yoluna girmesi ile ROS üretilir. Mitokondrideki elektron taşıma sisteminde elektron kaçakları ROS oluşumuna sebep olmaktadır [40,41].

2.6. INS-1E Hücre Hattı

Diabetes mellitus hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalarda çeşitli hücre hatları kullanılmaktadır. İnsülin salgılayan hücre hatları sıçan insülonoma hücre hattı (RIN), sıçan insülonoma hücre hattı (INS), transforme beta hücre hatları ve transgenik fareden elde edilen insülin salgılayan beta hücre hatları olan transgenik C57BL/6 fare insülonoma hücre hattı (MIN) ve hamster pankreatik beta hücresi (HIT) gibi pankreas

hücre hatları bulunmaktadır. Hücre hattı kullanmanın avantajı protein fonksiyonları, hücre sinyalleri gibi hücrel aktivitelemeler için uygun olmaktadır [82]. INS-1E pankreatik hücre hattı P. MAECHLER ve diğerelemeler tarafından INS-1 insülonoma hücrelerinin insülin stabilitesi sağlanarak üretilmiştir. INS-1 hücreleri glukozun varlığına cevap olarak insülin salgılaması özelliğı olmasına rağmen hücrel fonksiyon stabilitesi sağlanamadığı için yeni bir hücre hattı üretilmiştir. INS-1E hücre hattı insülin salgılaması bakımından stabilitesi sağlanabilmiş ve uzun süre yaklaşık 116 pasaja kadar verimli sonuçlar vermiştir [42].

2.7. Streptozotosinin Pankreatik β -Hücrelerinde Etkisi

Tip-1 ve tip-2 diyabet hastalığının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda modellenmesi için streptozotosin (STZ), hidrojen peroksit, alloksan gibi maddeler kullanılmaktadır [43]. Streptozotosin ilk bulunduğunda antibiyotik olarak kullanılmıştır. Ancak antibiyotik olarak kullanımı sonucunda pankreasta büyük hasara sebep olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple pankreasla ilgili modelleme çalışmalarında kullanılmaktadır (Şekil 2.3.) [43]. Deneysel çalışmalardaki diyabet modellemelerinde STZ kullanılmasının sebebi STZ'nin pankreas β hücrelerinde glukozu benzer yapısından dolayı ROS oluşturması ile insülin taşıyıcı kanallar olan GLUT-2'ye zarar vermesidir [44]. STZ, ROS ve nitrik oksit oluşumuna neden olur. STZ özellikle DNA, protein, lipidlere etki ederek bu moleküllerin parçalanmasına sebep olmaktadır. DNA'da kırıklara yol açarak hücreyi apoptoza götürür [45]. STZ pankreas β hücrelerinde nekroza da yol açmaktadır. STZ'nin süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikallerinin üretilmesine sebep olan poli-ADP ribozilasyonunun aktivasyonunu başlatabileceğı tespit edilmiştir [46]. STZ konsantrasyonlarının belirlenmesi için INS-1 hücre hattında yapılan çalışmada apoptoza yol açan miktarın düşük, nekroza yol açan miktarın yüksek olduğu bulunmuştur [47].

Pankreas β -hücreleri



Şekil 2.3. Streptozotosinin pankreas beta hücrelerine etkisi [48]

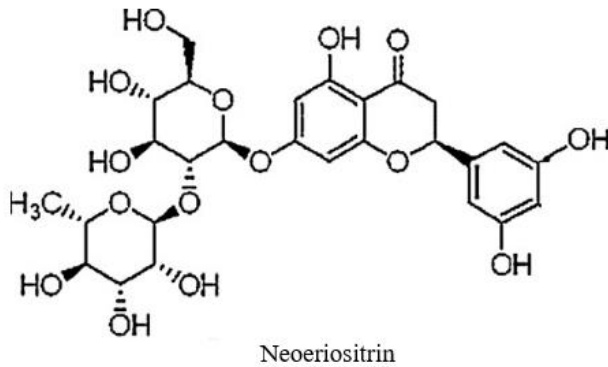
2.8. Diyabette Bitkisel Kaynaklar

Polifenoller, bitkilerin birçoğunda bulunan fitokimyasal bileşikler olup, 8000'den fazla bitki türünde bulunmaktadır. Bunlardan pek çoğunu tükettiğimiz bitkisel besin kaynakları içermektedir. Meyve, sebze, tahıl, baklagiller, çay, kahve, şarap ve kakao gibi pek çok bitkisel kökenli gıda polifenollerini içermektedir. Polifenoller yapısal olarak pek çok farklı şekilde bulunmakta ve çeşitlilik göstermektedir. Aromatik halkalarındaki hidroksi gruplarına göre pek çok ana gruba ayrılmıştır. Çeşitli gruplara ayrılmasına rağmen en başta gelenleri fenolik asitler, fenolik alkoller, stilbenler, lignanlar ve flavonoidlerdir [49]. Son yıllarda polifenollerle ilgili tıbbi amaçlı çalışmalar oldukça fazla yapılmaya başlanmıştır ve kronik hastalıklarda iyi sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle geleneksel tedaviler doğrultusunda pek çok bitkinin diyabet hastalığı için koruyucu veya iyileştirici etkisi olduğu bilinmektedir [50,51].

Polifenollerin alt gruplarından birisi olan flavonoidler iki aromatik halka olan A ve B halkası içerirler ve oksijenlenmiş bir heterosiklik halkayı oluşturan bir 3-karbon zinciriyle bağlı olan C halkasıyla da bağlıdır. Flavonoidler temelde 6 gruba

ayrılmaktadır. Flavan-3-ol, flavanonlar, flavonollar, antosiyanidinler, flavonlar ve izoflavonlar olmak üzere C halkasının genel yapılarındaki farklılıklara, halkalardaki işlevsel gruplara ve B halkasının C halkasına bağlandığı yere göre gruplandırılmaktadır. Flavonoidlerin insan sağlığı açısından önemli faydaları bulunmaktadır. Antioksidan özellikleri olduğu bilinen bu bileşiklerden flavanonlar, çay, kırmızı üzümde ve turunçgillerde bulunur, flavonlar yeşil çay yapraklarında, izoflavonlar baklagillerde, flavanoller çoğu bitkide, antosiyaninler kırmızı, mor ve mavi meyvelerde bulunmaktadır [52].

Özellikle Citrus (narenciye) cinslerinde bulunan neoeriositrin 1971 yılında satsuma narenciyesi, Takumanatsukunenbo, gençlik meyvesi gibi sitrus ailesine ait bitkilerin özütlerinden izole edilmiştir. Neoeriositrin, eriodictyol 7-O-neohesperidoside olarak bilinmektedir. Bu bitki özütlerinde belirli miktarlarda neoeriositrinin varlığı tespit edilmiştir [53]. Neoeriositrin flavonoidi (Şekil 2.4.) gruplandırma yapıldığında polifenollerden flavonoidler içerisinde ve flavanon sınıfı altında yer almaktadır. Flavanon sınıfında olan, kimyasal yapısı neoeriositrine benzeyen ve metabolik hastalıklarda tedavi için kullanılan naringinin ve eriositrinle yapılan çalışmalarda oldukça etkili sonuçlar elde edilmiştir [54,55].



Şekil 2.4. Neoeriositrinin kimyasal yapısı

Flavonoidlerin oksidatif stresi önleyici etkileri bilinmektedir. Ancak antioksidan etki flavonoid çeşitine ve hücre ya da doku tipine göre değişebilmektedir. Bir flavonoid olan neoeriositrinin antioksidan ve antidiyabetik etkisi bilinmemektedir. Neoeriositrin bazı bitkilerin meyve özütlerinde ve meyve sularında farklı miktarlarda bulunduğunu gösteren ve flavonoid karışımları şeklinde uygulamaların yapıldığı çalışmalar olmakla

birlikte neoeriositrinin tek başına antioksidan ve antidiyabetik etkisiyle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Özellikle Citrus cinslerinde bulunan turunçgillerden bazılarında limon ve bergamot gibi çok tüketilen bitki ve meyvelerde bulunmaktadır. Ayrıca portakal ve greyfurt meyve suyunda neoeriositrinin varlığı tespit edilmiştir. Naringinin flavonoidi ile kimyasal yapısının oldukça benzer olması ve naringinin antioksidan özelliği nedeniyle neoeriositrin diyabete karşı potansiyel koruyucu etkiye sahip olabilir.

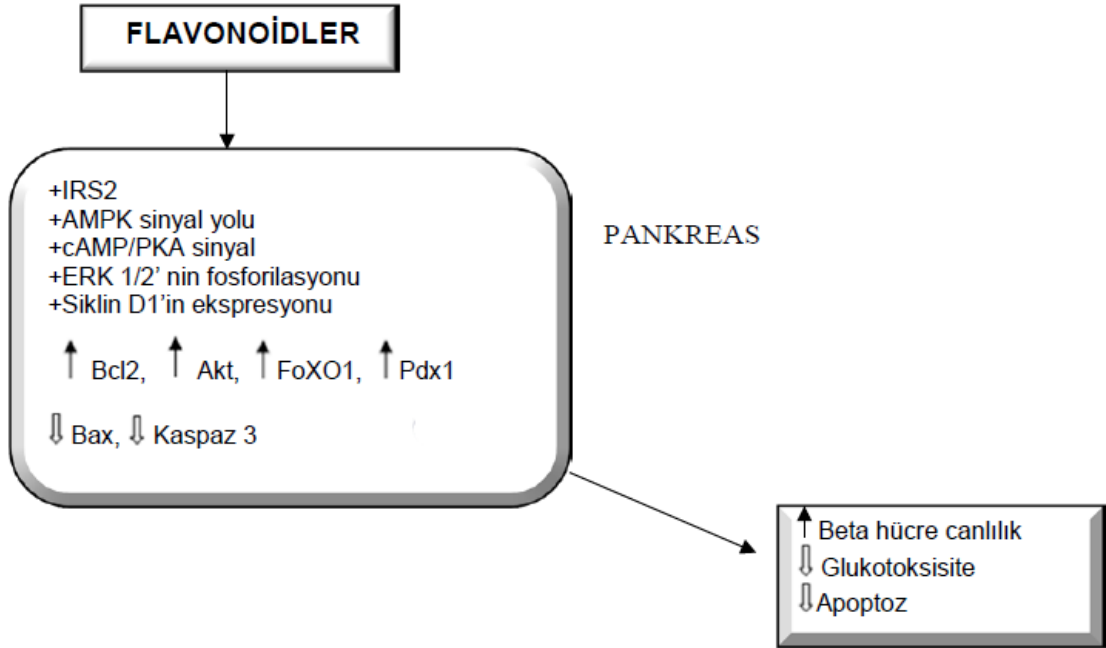
Rutaceae ailesinden *Poncirus trifoliata* (L.)'nın fitokimyasal analizi, hipoglisemik ve antioksidan etki değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışmada, hipoglisemik etkisi karbohidrat hidroliz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla analiz edilmiştir. Antioksidan bileşiklerin α -amilaz ve α -glikosidaz inhibisyonu gibi tip-2 diyabet ile ilişkili biyolojik hedefler üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada *Poncirus trifoliata*'dan elde edilen meyve suyu, tohum ekstratı ve esansiyel yağlar, nişasta veya maltoz solusyonuna eklenerek sırasıyla α -amilaz ve α -glikosidaz enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre fitokimyasal analizi yapılan bileşikler arasında neoeriositrinin en etkili antioksidan aktivite gösterdiği ve α -amilazı inhibe ettiği tespit edilmiştir [56].

Neoeriositrin *Drynaria* (eğrelti otu cinsi) bitkisinin rizomundan da izole edilmiştir. Yapılan bir çalışmada neoeriositrinin osteojenik farklılaşma ve proliferatif etkisi değerlendirilmiş, neoeriositrinin naringinden daha güçlü bir osteoproliferatif etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür [55].

Turunçgil meyvelerinden bergamotta naringinin, neoeriositrin ve neohesperidin gibi çeşitli flavonoidler önemli miktarlarda bulunmaktadır. *Citrus bergamia* (bergamot) meyve suyu ekstratı HPLC-UV metodu ile analiz edildiğinde neoeriositrin içerdiği bildirilmiştir. Bergamot polifenol fraksiyonunda (ve bergamot suyunda) bulunan flavonoidlerin %95'ini flavanonlar oluştururken, %5'lik kısmını flavonların oluşturduğu bulunmuştur. Yapılan HPLC ölçümünde tespit edilen flavanonlar arasında da en yüksek miktarda neoeriositrin bulunduğu gösterilmiştir. Bergamot suyunda neohesperidin, naringin ve neoeriositrin'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri yakın zamanda tanımlanmıştır [57]. Yine bergamotun antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özelliklerinin araştırıldığı çalışmada HPLC-DAD-MS/MS analizinde en yüksek oranda neoeriositrin bulunmuştur. Hücre kültürü çalışmasında neoeriositrinin antimikrobiyal özelliği belirtilse de antidiyabetik özelliğiyle ilgili bir bilgi verilmemiştir [57–60].

2.9. Flavonoidlerin Antioksidan Özellikleri ve Diyabete Etkisi

Yapılan çalışmalar ve analizler sonucunda flavonoidler bakımından zengin besinlerin tüketiminin kanser, diyabet, osteoporoz, nörodejaneratif bozukluklara karşı koruyucu ve engelleyici olduğu günümüzde bilinmektedir. Bazı flavonoidler antioksidan olarak diyabette kullanılan antidiyabetik ilaçların gösterdiği yan etkiler olmadan alternatif bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür [61]. Bununla birlikte flavonoidlerin antidiyabetik etkileri üzerine bilimsel ve klinik araştırmalar devam etmektedir. Flavonoidler, çeşitli moleküler hedefleri etkiler ve pankreatik β -hücreleri, hepatositler, adipositler ve iskelet miyofibrillerinde farklı sinyal yolları üzerinden hücreleri oksidanlara karşı korur (Şekil 2.5.). Flavonoidler insülin salımını artırarak, beta hücre apoptozunu önleyerek ve hücre proliferasyonunu sağlayarak diyabet hastalığına karşı yararlı etkiler gösterir. Kas ve yağ dokuda oksidatif stres, insülin direnci ve inflamasyonu azaltıcı etki gösterir [62]. Flavonoidler oksidatif stresi baskılayıcı özelliği ile oksidanlara hidrojen protonu aktarak reaktif oksijen türlerini etkisizleştirirler [63].



Şekil 2.5. Flavonoidlerin pankreas üzerindeki etkileri [62]

Flavonoidler antioksidan özellikleri nedeniyle diyabet hastaları tarafından geleneksel olarak kullanılmaktadır. Geleneksel olarak kullanılan bitkilerin etkilerinin ortaya çıkarıldığı çok sayıda bilimsel çalışma vardır. Flavonoidler metabolik hastalıkların

tedavisinde oldukça yaygın kullanılan bir fitoterapi yöntem olma yolunda ilerlemektedir. Günümüzde dünyada çok fazla insanda görülen ve sayısı gittikçe artmaya devam eden diyabet hastalığı için çeşitli tedaviler kullanılmaktadır. İnsülin direnci aşamasında genellikle sağlıklı beslenme ve spor tavsiye edilirken, ileri düzeyde diyabet hastalarında pankreas hasar görmektedir. Çeşitli kimyasal ilaçlar ile düzeltilmeye çalışılsa da diğer yandan diyabet için kullanılan ilaçların olumsuz etkileri söz konusudur. Flavonoidlerin çeşitli türlerinin antiinflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik etkileri bilinmektedir.

Pankreas beta hücre hasarı tip-2 diyabet hastalığında önemli bir nedendir. Pankreas hücre hasarı hücre metabolizmasındaki üç yol üzerinden etkiyle ortaya çıkmaktadır.

- 1) Mitokondride krebs döngüsünde oksidatif stres
- 2) Hücre çekirdeğindeki DNA/RNA oksidatif stres
- 3) Serbest yağ asitlerinin artması ile membran bütünlüğünün bozulması

Flavonoidler genellikle mitokondride oluşan krebs döngüsündeki oksidatif stres veya hücre çekirdeğindeki DNA/RNA oksidatif stres yollarında antioksidan özellik göstermektedir [64]. Şeker hastalığının tedavisinde potansiyel nutrasötikler olarak diyetsel polifenollerin hipoglisemik etkilerinin glukoz metabolizmasına katılan enzimlerin modülasyonu, pankreas β -hücre fonksiyonunun ve insülin etkisinin iyileştirilmesi ve de insülin sekresyonunun uyarılmasıyla olduğu rapor edilmiştir [51]. Flavonoidlerin diyabet üzerinde antioksidan etki göstermesi birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla desteklenmiştir [65–67].

Bitki özütlerinin ve flavonoidlerin diyabet hastalığı üzerine etkisiyle ilgili farklı pankreatik hücre hatlarında yapılmış çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmada kuşburnu meyvesinin antidiyabetik etki mekanizması *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. BTC6 pankreatik hücre hattında STZ ile indüklenen hücre ölümünde kuşburnunun koruyucu etkisi saptanmıştır [68]. Apigenin flavonoidinin antidiyabetik etkisinin araştırıldığı çalışmalardan birinde RINm5F hücre hattında STZ uygulanarak diyabet modeli oluşturulmuş ve apigeninin beta hücrelerini oksidatif strese bağlı hücre hasarından koruduğu bulunmuştur. Ayrıca antioksidan enzimler olan Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerine bakılmış ve STZ'ye oranla apigenin+STZ grubunda enzim aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Antioksidan etkisi bilinen bir aminoasit olan N-asetil L-sistein(NAC)

ile karşılaştırılması yapılmış ve benzer etkiler elde edilmiştir [69]. *Ishige foliacea* bitkisinden izole edilen ve yeni bir fenolik bileşik olan Octaphlorethol A'nın, STZ ile indüklenmiş apoptozis ve oksidatif stresi azaltıcı etkisi görülmüştür. Çalışmada STZ uygulanmasıyla RINm5F pankreas beta hücre hattında insülin seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Octaphlorethol A uygulaması ile oksidatif stres ve hücre ölümünün azalmasına bağlı olarak insülin seviyesinde artış görülmüştür. SOD, CAT, GSH-Px antioksidan enzim ölçümleri yapılmış ve Octaphlorethol A miktarındaki artışa bağlı olarak analiz edilen enzimlerde de artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi belirlenmiştir [70].

Bir başka çalışmada ise *Radix astragali*, *Radix codonopsis* ve *Cortex lycii* isimli üç bitkinin sulu ekstratlarından oluşturulan SR10 karışımı hazırlanmış ve *in vitro* koşullar altında antidiyabetik etkisi incelenmiştir. SR10, STZ uygulanan pankreatik beta hücrelerinin canlı kalma oranını arttırmış ve DNA fragmentasyonunu, sub-G1 pik alanını ve apoptotik hücrelerin yüzdesini azaltarak β hücrelerinin apoptozunu azaltmıştır. Ayrıca STZ ile ortaya çıkan nitrik oksit oluşumu engellenmiştir [71]. Tyrosol, zeytinyağında bulunan önemli fenolik bileşiklerden biridir ve diyabetik sıçanlarda hiperglisemiyi iyileştirdiği için NIT-1 hücre hattında diyabetteki moleküler mekanizması araştırılmıştır. Tyrosol NIT-1 hücrelerine uygulandığında apoptoz ile ilgili Bcl-2 protein ailesini düzenlediği, kaspaz 3'ün etkisini azalttığı, endoplazmik retikulum stresini azalttığı ve buna bağlı olarak beta hücrelerinin ölümüne karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Tyrosol'un tip-2 diyabet hastalığının iyileştirilmesinde potansiyel bir aday olduğu rapor edilmiştir [72].

Diyabette şeker düzeyini dengeleyen tarçının antidiyabetik özelliği çalışılmıştır. *Cortex cinnamomi* (tarçın türü)'nin antidiyabetik ve antiinflamatuvar etkisi araştırılmış ve çalışmada RINm5F hücre hattı kullanılarak STZ ile oluşturulan beta hücre hasarının *Cortex cinnamomi* tarafından önlendiği bildirilmiştir [67].

Dafnetin, *Daphne koreana* Nakai ve *Daphne odora* Thunb. (Thymelaeaceae) bitkilerinden izole edilen antioksidan ve antidiyabetik özelliği bilinen biyoaktif bir bileşiktir, ancak etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Dafnetinin antiapoptotik ve antidiyabetik özelliği INS-1 hücre hattında STZ ile oluşturulan diyabet modelinde çalışılmış, yüksek ve düşük glukoz konsantrasyonunda insülin salgılanması araştırılmıştır. Sonuçta dafnetinin insülin salgılanmasında uyarıcı etki sağladığı ve apoptotik yolun düzenlenmesine bağlı olarak diyabetin tedavisinde kullanılabileceği

tespit edilmiştir [73]. Bir başka çalışmada baklagillerde bulunan ve bitkisel ilaçlarda kullanılan bir flavonoid olan genistein izoflavonu, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlara uygulanmış ve sonuçta pankreastaki adacıklarda ve insülin salgısında diyabetin neden olduğu hasarları iyileştirici etkiler gösterdiği belirlenmiştir [74]. Geleneksel olarak diyabet tedavisinde kullanılan bir flavonoid olan morin guava yaprakları, soğan, elma ve diğer *Moracea* ailesi bitki türlerinde bulunmaktadır. Vanitha ve ark. tarafından sıçanlarda morinin antidiyabetik etkisi gösterilmiştir. INS-1E hücre hattı kullanılarak diyabetin en belirgin sebeplerinden olan oksidatif strese karşı spesifik olarak DNA'yı koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca morin hücredeki oksidatif stres düzeyini azaltmış ve antioksidan enzim miktarını arttırmıştır. Hücre yolağı olarak Nükleer faktör eritroid ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)'yi aktive ederek hücreyi diyabet etkisinden korumuştur [75].

Lentinus edodes (şitaki mantarı)'dan saflaştırılmış bir aktif madde olan letinan, INS-1 pankreas beta hücre hattında STZ ile oluşturulan apoptoz ve hücre işlev bozukluğunda koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. ROS ölçüm testi kullanılarak hücrelerdeki ROS içeriği belirlenmiş ve letinan ve STZ uygulanan grupta nitrik oksit sentezi büyük ölçüde engellenmiştir. Hücrelerin insülin miktarında artış gözlemlendiği belirtilmiştir [76]. Bir başka çalışmada ise kahvenin kavrulmasıyla oluşan yan ürün olan kahve çekirdeği zarı ekstratı, klorojenik asit ve kafeinin antidiyabetik etkisi incelenmiştir. INS-1E hücrelerinde bu ekstratlar uygulandıktan sonra STZ uygulaması yapılan çalışma sonucunda coffee silverskin ekstratının insülin salgılanmasını düzenlediği ve potansiyel bir antidiyabetik madde olabileceği bildirilmiştir [62].

2.10. Apoptoz ve Nekroz

Apoptoz ve nekroz hücrelerin kendi kendini yok etmelerini sağlayan aslında hücre homeostazisini korumaya yönelik vücudun aldığı bir önlemdir. Apoptoz ve nekroz iki farklı şekilde hücreyi ölüme götüren yoldur. Nekroz, hücre zarının parçalanması ile dıştan içe gerçekleşen bir ölüm yoludur. Apoptoz hücrenin özellikle membranlarında büzüşme göstermesi, ancak hücre zarının bozulmamış olması ve piknotik çekirdek ile karakterizedir. Apoptoz hücrede bir dizi gen, Ca^{+2} ve ATP dengelerinin bozulması ile meydana gelir. Apoptozun sebep olduğu hastalıklardan biride insülin bağımlı diyabettir [77]. Şekil 2.6.'da apoptoz ve nekrozun özellikleri verilmiştir.

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol Açan Başlıca Nedenler	<ul style="list-style-type: none"> • Viral enfeksiyon • Hipertermi • Hipoksi • İskemi • Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonu • Şiddetli oksidatif stres 	<ul style="list-style-type: none"> • Büyüme faktörü eksikliği • Hücre yaşlanması • Radyasyon • Sitotoksik T lenfositler • Kanser ilaçları • Yüksek doz glukokortikoid
Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler	<ul style="list-style-type: none"> • Bozulmuş iyon hemostazisi • Hücre lizisi ve membran kaybı • Organel bütünlüğü kaybolması • Lizozomal enzimler salgılanır • Hücreler çok sayıda ve beraber ölür 	<ul style="list-style-type: none"> • Kromatin yoğunlaşması • Hücre küçülmesi • Organeller sağlamdır • Apoptotik cisimciklerin oluşması • Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür

Şekil 2.6. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar [78]

Hücre canlılığını tespit etmek için pek çok farklı yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları kalorimetrik olarak ölçülürken bazıları floresans temelli ölçüm teknikleridir. Görsel olarak değerlendirmeler de destekleyici yöntemler arasındadır.

2.11. Hücre Canlılık Testleri

2.11.1. Kristal Viyole Canlılık Testi

Kristal viyole boyaması *in vivo* doku kesitlerinde kullanılabildiği gibi hücre kültüründe canlılık testi için DNA'yı boyayan güvenilir yöntemlerden biridir. Kristal viyole boyası özellikle yüzeye tutunan hücrelerin belirlenmesi için çok etkili bir yöntemdir. Hücre ölümü sırasında hücre kültüründe yüzeye yapışan hücreler yapışkan yüzeydeki elektronizasyon değişimi etkisiyle yüzeyden ayrılır. Plak yüzeyine tutunmayı bırakmış hücreler zaten ölü hücreler olmakla beraber canlı hücreler DNA'ya bağlanan kristal viyole boyası ile DNA'yı mavi-mor renge boyar. Ölü hücreler açık renk ile düşük değer verirken, canlı hücreler DNA boyadıkları için koyu bir mor renk ile yüksek absorbans değeri vererek spektrometre cihazında okunur [79,80].

2.11.2. Tripan Mavisi Canlılık Testi

Tripan mavisi hücre canlılığını belirlemek için kullanılan boyalardan biridir. Yüzeye yapışan veya süspansiyon hücrelerde etkili kullanımı olan bir yöntemdir. Tripan mavisi boyamada canlı hücreler hücre zarı bütünlüğü korunduğu için boyayı içine alamaz, ancak ölü hücreler hücre zarı bütünlüğü bozulduğu için tripan mavisi boyası hücre içine girerek hücre sitoplazmasını mavi ile boyar [79,81].

2.11.3. Akridin Oranj (AO)/ Propidyum İyodit (PI) Boyama

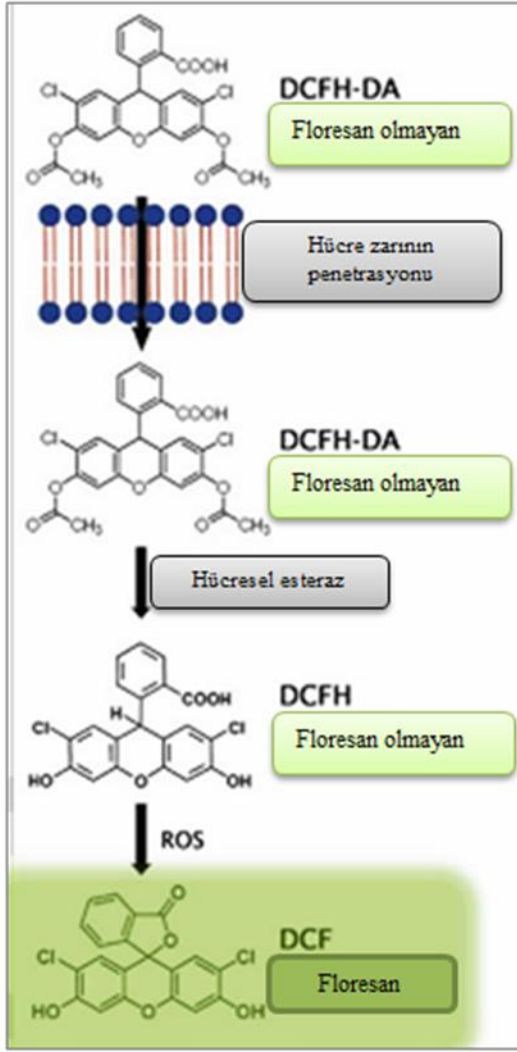
Akridin oranj (AO) ve propidyum iyodit (PI) floresan ile görüntülenebilen boyalardır. Hücre canlılığı için ikili boyama yaparak hücre ölüm yolu belirlenir. Floresan boyalar hücredeki DNA'ya bağlanarak hücre DNA'sının görüntülenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Akridin oranj apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılırken, propidyum iyodit nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. PI, membrandan geçemeyen özellikte olduğu için sadece canlı olmayan hücrelere girip DNA'yı boyadığı için membran bütünlüğü bozulmuş olan yani nekrotik hücreleri boyar. AO ise membrandan geçebilen iyonik bir yapısı olduğu için apoptoz çeşitlerinin belirlenmesinde kullanılır. Floresan mikroskopunda AO floresan boyası yeşil renk ve PI floresan boyası turuncu renk verir [82].

2.12. Glukoz Uyarımlı İnsülin Miktar Tayini

İnsülin miktarı kolorimetrik olarak ELISA okuyucuda ticari kitle yapılabilmektedir. Kitin çalışma prensibi yarışmalı inhibisyona dayanmaktadır. Asetilkolinesteraz (AChE) ile insülin, antiserum içeren bölgeye bağlanmak için rekabete girerek insülin miktarı belirlenir. İnsülin antiserum bölgelerine bağlanması için ya serbest insülin ya da AChE, keçi antiserum-Gine-domuzu antikör taşıyıcı tarafından immünohistokimyasal indirekt yöntemine dayalı olarak Gine-domuzu antiserum-sıçan insüline bağlanmaktadır. Ellmanın reaktifi ile kromojen sarı ışığa verir. Absorbans değerleri bu sarı ışık yoğunluğuna göre ölçülmektedir. Sarı ışık yoğunluğuna bağlı olarak insülin varlığı ELISA okuyucuda okunur. Protein başına düşen insülin miktarının tespiti için protein tayininde biskininik aside (BCA) dayalı deterjan uyumlu bir formülasyon içeren kit kullanılmıştır. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılarak doğruluğu kolorimetrik ölçüm ile sağlanır [83].

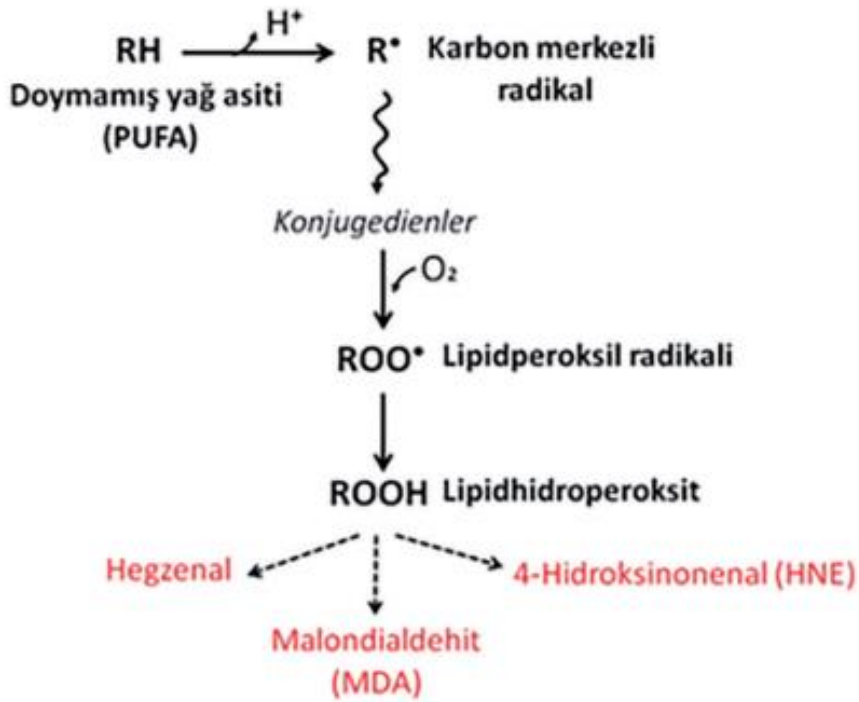
2.13. Oksidatif Stres Testleri

Oksidatif stres ölçümünde kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemlerden birisi DCFHDA yöntemidir. 2', 7'-dikloroflüoresin diasetat (DCFHDA) özellikle ROS ve reaktif oksijen türlerini belirlemede kullanılan en yaygın boyalardan biridir. DCFHDA floresan boyası, reaktif oksijen türlerini yakalaması ile oksidatif stres varlığı tespit edilir. Hücrenin içerisinde bulunan esterazlar ile DCFHDA etkisizleştirilir ve reaktif oksijen türlerinin varlığında indirgenmesi ile 2', 7'-diklorofloresine (DCF)'ye dönüşür. DCF floresan spektrometrede ışığa verir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. DCFHDA boyama yöntemi [84]

Diyabet hastalığının altında yatan mekanizma hücrelerin oksidatif stres ve/veya lipid peroksidasyon ile karakterize edilmiştir. Lipid peroksidasyon, hücrelerin oksidatif stres koşullarında hidrojen peroksitin toksik etkisiyle hücre zarına hasar vermesidir. Hücre zarında metal iyonlarını indirgeyerek malondialdehit (MDA) gibi lipid yapısını bozan bileşiklere dönüşür. Malondialdehit içeriğindeki peroksit yapıları hücre zarındaki lipitlere saldırarak elektronları alır ve hücrenin lipid bütünlüğünü bozarak hasara uğratar [85,86]. Lipid hidroperoksitleri ve aldehytler genel olarak tiyobarbitürik asit reaktif substratı (TBARS) olarak isimlendirilir ve lipid peroksidasyona neden olurlar. TBARS, lipid peroksidasyon ölçümünde kullanılan yaygın ve en hassas yöntemlerden biridir. Lipid peroksidasyon ölçümü için MDA ve TBARS miktarları birbirine eşdeğerdir (Şekil 2.8.) [26,87].



Şekil 2.8. Lipid peroksidasyon testi [26]

2.14. İstatistik Analizler

Çalışma kapsamında yapılan deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler IBM SPSS statistics 23 programı kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. İstatistiksel analizler $p \leq 0,05$ önem kontrolü düzeyinde yapılmıştır. Deneylerde zaman faktörü sabit olduğu için tek değişken olarak sadece uygulama ve doz gruplarının olması nedeniyle elde edilen verilere tek yönlü varyans (one way ANOVA) testi uygulanmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan neoeriositrin (13241-32-2, %95 saflıkta) Santa Cruze firmasından temin edilmiştir. Dimetil sülfoksit (Applichem, 01A3672,0100), neoeriositrin'in çözdürülmesinde ve hücrelerin dondurulmasında kullanılmıştır. Streptozotosin (Santa Cruze, 18883-66-4, %98 saflıkta) ile diyabet modeli oluşturulmuştur. Hank's Balance tamponu (55037C) Sigma firmasından temin edilmiştir. STZ'in çözdürülmesi için pH:4 olan Sitrat Buffer (Sigma, C2488) tampon olarak kullanılmıştır. Sigma'dan temin edilen NAC (616-91-1) çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. İnsülin testi için düşük ve yüksek glukoz derişimleri için glukoz (Merck, ORM108337.1000) kullanılmıştır.

ROS ölçümü DCFHDA (Sigma, D6883) ile ölçülürken, lipid peroksidasyonu ölçümü için TBARS kiti (Cayman, 10009055) kullanılmıştır. Hücre sayımı Tripan mavisi (Hyclone, Logan, UT) boyama ile yapılmıştır. Çalışmada Akridin oranj (Sigma, A6014-10G) /Propidyum iyodit (Applichem, 01A2261,0025) boya ile floresan boyama yapılmıştır. Kristal viyole (Merck, C.I. 42555) boyası hücre canlılığının tespitinde kullanılmıştır. İnsülin ölçümü ise Cayman marka Rat insülin ELISA kiti (A05105) kullanılarak yapılmıştır.

3.2. INS-1E Hücre Hattı ve Kültüre Edilmesi

Tez çalışmasında sıçandan elde edilen pankreatik beta hücre hattı olan INS-1E hücreleri kullanılmıştır. INS-1E hücre hattı Maechler ve arkadaşlarından temin edilmiştir [42]. INS-1E hücrelerinin özel ve hassas yapısı nedeniyle kültüre edilmesinde kullanılan besiyerinde gerekli bileşenler olmalıdır. Temin edilen hücreler pasaj 49'dur. Temin edildiği andan itibaren steril koşullar altında üretilip, pasajlanmış ve dondurulmuştur. INS-1E hücreleri %10 fotal sığır serumu, 1 mM sodyum piruvat, 50 µM 2-merkaptotanol, 2 mM L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, 10 mM HEPES tamponu, içeren RPMI 1640 besiyeri içinde %5 karbondioksit içeren 37°C'lik etüvde filtreli flasklarda kültüre edilmiştir. Bu hücreler adherent yani yüzeye yapışan hücre olmasına rağmen çok hassas oldukları için yüzey bağlantılarını kolaylıkla koparabilmektedirler. Hücreler yaklaşık 5-10 gün arasında flask yüzeyini kaplayacak duruma gelmektedir. İlk olarak 75 cm²'lik flask yüzeyi %80-90 hücre ile kaplandığında adherent özellikte olan bu hücreleri yüzeyden kaldırmak için 2 ml Tripsin/EDTA solüsyonu ile bir kere yıkama

yaptıktan sonra tekrar 1,5 ml Tripsin/EDTA koyulmuş ve içinden 0,5 ml Tripsin/EDTA çekilip atılarak son olarak içinde 1 ml bırakılmıştır. Flask etüv içerisinde 1-2 dakika bekletilip çıkarıldıktan sonra hücreler kolaylıkla yüzeyden ayrılmıştır. Tripsin/EDTA aktivitesini inhibe etmek için 4 ml besiyeri konulmuş ve cam pipet yardımıyla hücrelerin kümelenmemesi için pipetaj yapılmıştır. Süspansiyon duruma gelen hücreler flasktan alınarak uygun miktarda paylaştırılmış ve etüve koyulmuştur. Çalışmalar pasaj 55 ile pasaj 70 arasındaki hücrelerle yapılmıştır.

Bu hücreler kriyotüp içerisinde -196°C sıvı azot tankında saklanmaktadır. Hücreler çözülürüleceği zaman azot tankından çıkarılmış ve çözülmesi için birkaç dakika 37°C 'lik su banyosunda çözülmesi beklenmiştir. Daha sonra pelet kısmını alabilmek için 800 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücrelerin olduğu pelet üzerine 1 ml besiyeri ile pipetaj yapılmıştır. Hücrelerin sayısına göre 25 cm^2 'lik veya 75 cm^2 'lik flaslara aktarılmıştır. Flask üzerine gerekli besiyeri ilave edilerek 37°C 'lik ve %5 CO_2 ' lik etüvde inkübe edilmiştir.

Dondurma işlemine başlamadan önce dondurma vasatı hazırlamak gerekmektedir. Dondurma vasatı içeriği %10 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besiyeridir. Hücreler dondurulmadan önce bu dondurma vasatı hazırlanmış ve $+4^{\circ}\text{C}$ buzdolabında bekletilmiştir.

Hücreler pasajlama işleminde olduğu gibi olgunlaştıktan sonra tripsinizasyonla kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler 800 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerindeki süpernatant atılmış ve pelet kısmının üzerine hazırlanmış olan dondurma vasatı eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra kriyotüplere paylaştırılmıştır. Kriyotüplerin üzerine pasaj sayısı, tarih gibi bilgiler yazılarak tüpler önce -80°C ' de 1 gün bekletildikten sonra -196°C sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir.

3.3. Hücre İkileme Zamanının Belirlenmesi

Deneylere başlamadan önce hücrelerin üreme karakterizasyonunun ve kendi sayısını ikiye katlama süresinin bilinmesi gereklidir. Özellikle INS-1E hücre hattı transforme hücre hattı olduğu için oldukça değişik karakteristiği vardır. Hücre pasajlanması işleminden sonra hücreler birbirinden ayrılarak yüzeyden kalkar. Hücrelerin tekrar birbirleriyle olan bağlantılarını kurabilmesi ve ekildiği yerin yüzeyine yapışması için belirli bir sürenin geçmesi gereklidir. Hücreler flaska ekildiğinde birkaç saatten birkaç

güne kadar değişebilen, sayılarını ikiye katlamasına kadar olan süre lag fazı olarak adlandırılır. Hücreler lag fazından sonra log fazına geçmektedir. Log fazı hücrelerin sayıca kendilerini ikiye katladıkları evredir ve ikileme zamanı denilmektedir. Hücreler log fazında üremelerini sona erdikten sonra ölüm yoluna girmektedir. Bu evreye gelmeden hücrelerin pasajlanması gerekmektedir [72]. Hücre ikileme zamanını tespit etmek için INS-1E hücreleri 6 kuyucuklu plağa hemositometre lamında tripan mavisi boyaması ile sayım yapılmış ve 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde her kuyucuğa 2 ml hücre süspansiyonu ekilmiştir. 12 gün boyunca hücreler 1 kere tripsin/EDTA ile yıkama yapıldıktan sonra 300 µl tripsin /EDTA eklenerek etüvde 30 sn bekletilmiştir. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra 900 µl besiyeri ile süspanse edilmiş ve birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Hücre sayımı için hemositometre (Bürker lamı) kullanılmıştır. Süspanse hücre içerisinden 900 µl alınmış ve 100 µl tripan mavisi boyası eklenerek pipetaj yapılmıştır. Bürker lamında ışık mikroskopunda (Olympus CX21, Amerika) görüntülenerek sayım yapılmıştır. Canlı hücreler beyaz görülürken, ölü hücreler mavi boyanmıştır. Tripan mavisi boyaması 12 gün boyunca devam ettirilmiş ve hücreler her gün sayılarak hücre ikileme zamanı hesabı yapılmıştır.

3.4. Streptozotosin, Neeriositrin ve NAC Ana Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

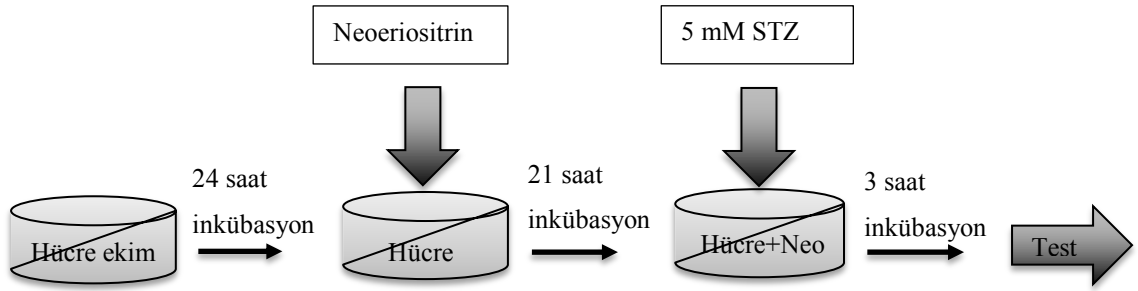
Çalışmada diyabet modeli oluşturmak için streptozotosin kullanılmıştır. Uygun saklama koşullarında bulunan (-20°C) streptozotosin (STZ) çözmek için sitrat buffer tamponu kullanılmıştır. STZ ana stok konsantrasyonu 188 mM olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan bu ana stok steril etmek için filtre edildikten sonra farklı konsantrasyon denemelerinde kullanılmak üzere besiyeri ile seyreltilerek ayarlanmıştır. STZ için LC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi için 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM konsantrasyonları denenmiştir.

Neeriositrin ana stok hazırlanması için 1 ml DMSO'da kabin içerisinde steril koşullarda çözülmüştür. Neeriositrin ana stok konsantrasyonu -20°C'de tutulmuştur. Çalışmada kullanılacak neeriositrinin koruyucu konsantrasyonunun belirlenmesi için 0,25 µM-100 µM aralığında neeriositrin konsantrasyonları ile kristal viyole hücre canlılık testi yapılmıştır. Kristal viyole testinden elde edilen sonuçlara göre 0,25 µM, 0,5 µM ve 1 µM konsantrasyonları seçilmiştir.

NAC (N-asetil L-sistein), antioksidan özelliği biliniyor olması nedeniyle çalışmada pozitif kontrol olarak (1 μ M) kullanılmıştır. NAC, ana stok PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Çözülen NAC (Sigma A9165) sterilizasyon için filtre edilmiş ve NAC ana stoğu -20° C’de saklanmıştır.

3.5. Deney Planı

1. Grup: Kontrol
2. Grup: 5 mM STZ
3. Grup: 1 μ M NAC+STZ (pozitif kontrol)
4. Grup: 0,25 μ M Neoeriositrin+STZ
5. Grup: 0,5 μ M Neoeriositrin+STZ
6. Grup: 1 μ M Neoeriositrin+STZ



Şekil 3.1. Deney grupları ve deney planı

3.6. Kristal Viyole Hücre Canlılık Testi

Tez çalışması kapsamında diyabet modeli oluşturmak için STZ kullanılmış ve uygulama sonrası hücre canlılık testleri yapılmıştır. Flavonoidlerin fazla miktarı toksik olabildiği için sitotoksosite testleri ile neoeriositrinin koruyucu etkisinin yanı sıra toksik etkisi de değerlendirilmiştir.

INS-1E hücrelerinde diyabet modeli oluşturmak için gerekli olan STZ konsantrasyonunu tespit etmek üzere kristal viyole testi ile belirlenmiştir. Bu test için 0,1 g kristal viyole boyası 100 ml distile su ile çözülerek hazırlanmıştır. Daha sonra 0,22 μ M uçlu enjektör filtresi ile süzülmüştür.

Kristal viyole testi için INS-1E hücreleri süspanse hale getirilerek 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Hücreler tutunması için 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 koşullarında etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Besiyeri koyularak 21 saat sonra 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM STZ konsantrasyonları eklenerek etüvde 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerde hasar oluşturan STZ'nin LC_{50} konsantrasyonu kristal viyole testi yapılarak tespit edilmiştir. STZ farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulanarak kristal viyole testi ile INS-1E hücrelerinde diyabet modeli oluşturmada en uygun süre ve konsantrasyon belirlenmiştir. Mevcut laboratuvar koşullarında 3 saat süreyle 5 mM STZ uygulaması diyabet modellemesi için uygun bulunmuştur.

Neoeriositrin flavonoidinin koruyucu etki oluşturan konsantrasyonlarının belirlenmesi için de kristal viyole hücre canlılık testi yapılmıştır. Neoeriositrinin artan dozlarına bağlı olarak $2 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda toksik etki görüldüğü için en yüksek doz olarak $1 \mu\text{M}$ seçilmiştir. INS-1E hücreleri aynı şekilde 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Neoeriositrin konsantrasyonları besiyerinde hazırlanmış ve hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilip atıldıktan sonra her kuyucuğa neoeriositrinin $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ konsantrasyonları ve pozitif kontrol olarak NAC $1 \mu\text{M}$ konsantrasyonu $100 \mu\text{l}$ olacak miktarda eklenmiştir. Plaklar 21 saat sonra etüvden çıkarılmış ve 5 mM STZ konsantrasyonu kuyucuklara eklenerek 3 saat daha etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada kontrol grubu, STZ grubu, pozitif kontrol (NAC) grubu ve neoeriositrinin üç farklı konsantrasyon grubu olmak üzere toplam 6 grup yer almıştır. Etüvden çıkarılan plaklara aşağıdaki protokol uygulanmıştır. Deneyler en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

1. Plak 3 saatlik sürenin sonunda dışarı çıkartılmış ve içeriği atıldıktan sonra %10 formaldehit içeren fiksatif ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
2. Plak içeriği çekilmiştir. Hazırlanan kristal viyole boyasından $100 \mu\text{l}$ her kuyucuğa eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4-5 kere distile su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır.
3. Her kuyucuğa $100 \mu\text{l}$ %10 asetik asit eklenmiş ve kristal viyole boyası ile kolorimetrik reaksiyon oluşmuştur. ELISA cihazında okunabilmesi için hazır duruma getirilmiştir.
4. Plak, mikropalak okuyuculu spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okutulmuştur (BIO-TEK μQuant , BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika).

Ölçüm sonucunda çıkan optik dansite (OD) değeri ile % canlılık hesabı aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Canlı hücre} = [(\text{uygulama grubu OD değeri}) / (\text{kontrol grubu OD değeri})] \times 100$$

3.7. Tripan Mavisi Boyama

Tripan mavisi boyama için 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde her kuyucuğa INS-1E hücre süspansiyonundan 2 ml ekim yapılmıştır. 6 kuyucuklu plak 24 saat hücrelerin yüzeye tutunması için 37 °C ve %5 CO₂ koşullarındaki etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Besiyeri çekilmiş ve yerine kontrol için besiyeri, 5 mM STZ yerine besiyeri, 0,25µM, 0,5 µM ve 1 µM neoeriositrin ve de 1µM NAC besiyerinde sulandırılmış bir şekilde her kuyucuğa 100 µl koyulmuştur. 21 saat etüv içerisinde inkübe edildikten sonra STZ grubu ve flavonoid içeren kuyucuklara 100 µl 5 mM STZ eklenmiş ve diyabet modeli oluşturmak için 3 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca aynı koşulları sağlamak için kontrol grubuna aynı miktarda besiyeri eklenmiştir. 5 mM STZ ile 3 saat inkübe edildikten sonra diyabet modeli oluşturulmuştur. Plak etüvden 3 saat sonra çıkarılmıştır. Süspansiyon hücreler toplanmış ve adherent hücreler yüzeyden tripsin/EDTA ile kaldırılmış ve 900 µl süspansiyon hücreye 100 µl tripan mavisi boyası eklenerek bürker lamında hücrelerin sayımı yapılmıştır. Işık mikroskopunda tripan mavisi boyası prensibinde negatif iyonik boyaya sahip olduğundan canlı hücre zarından geçemediği için canlı hücreler beyaz görünürken, ölü hücrelerin hücre zarı parçalanmasından dolayı mavi boya ile boyanmış görülmektedir. Hücre canlılığını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ Canlı hücre} = (\text{Canlı hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

3.8. Akridin Oranj/ Propidyum İyodit Boyama

Neoeriositrinin pankreatik beta hücrelerinde koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, hücre ölüm tipini belirlemek için AO/PI boyamasında aşağıdaki protokol izlenmiştir.

1. INS-1E hücreleri $2,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde steril kabin içerisinde 24 kuyucuklu plağa ekilmiştir.
2. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra besiyeri atılmış ve yerine hazırlanan neoeriositrin konsantrasyonları ile 21 saat inkübe edilmiştir.
3. Diyabet modeli oluşturmak için 5 mM STZ eklenerek 3 saat etüvde inkübe edilmiştir.
4. Etüvden çıkarıldıktan sonra PBS ile yıkanmış ve AO/PI ikili floresan boyası $1 \mu\text{g/ml}$: $1 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde hücreler 30 sn boyanmıştır.
5. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra PBS varken inverted mikroskopta (Olympus IX70, Japonya) görüntüleme yapılmıştır.
6. Fotoğrafları çekilerek hücre ölüm tipi değerlendirilmiştir.

Mikroskop görüntüsünde inceleme yapılırken kondanse hücre bütünlüğü bozulmuş olduğu için nükleus turuncu renk ile boyanır ve nekroz olarak değerlendirilir. Hücre bütünlüğü bozulmayan hücreler yeşil renkli ise canlı, ancak hücre çekirdeklerinde parçalanma gösteriyorsa apoptotik hücreler olarak tanımlanır. Üç tekrar yapılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.9. Glukoz Uyarımlı İnsülin Miktar Ölçüm Testi

INS-1E hücre hattının glukoz seviyesine duyarlı olması nedeniyle neoeriositrin insülin salgılanması üzerine etkisini değerlendirmek için düşük (5,5 mM) ve yüksek glukoz (16,7 mM) koşullarında aşağıda verilen yöntem izlenerek hazırlanan lizatlarda SPI BIO (A11105, Bertin, France) insülin kiti ile ölçülmüştür.

1. INS-1E hücreleri 24 kuyucuklu plaklara $2,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat etüvde uygun koşullarda inkübe edilmiştir.
2. Neoeriositrin için uygulama dozları hazırlanıp plak içerisindeki besiyeri atıldıktan sonra kuyucuklara 0,5 ml koyulmuştur.
3. Neoeriositrin ile 21 saat inkübe edildikten sonra 5 mM STZ ile 3 saat inkübe edilerek diyabet modellemesi oluşturulmuştur.
4. Lizat toplamak için hücreler glukozsuz ortamda 2 saat etüvde bırakılmıştır.

5. Hanks Balance tamponu ile 2 kere yıkandıktan sonra 5,5 mM glukoz içeren hanks balance tamponu ile 1 saat etüvde bekletildikten sonra besiyeri toplanmıştır. Lizatlar -80°C’de saklanmıştır.

6. Yüksek glukoz (16,7 mM) içeren hanks balance tamponunda 1 saat etüvde bekletildikten sonra lizatlar toplanıp -80°C’de saklanmıştır.

Kit içeriğindeki antijen kaplı kuyucuklar kullanılarak kit içeriğindeki yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra örnekler koyulmuştur. Kit içerisindeki insülin tracer ve insülin antiserum uygulamaları yapıldıktan sonra 16-20 saat 4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Kit içerisinde bulunan Ellman’s reaktifi hazırlanmıştır. Kuyucuklar soğuk ortamdan çıkarılarak yıkama tamponu ile yıkanmıştır ve Ellman’s reaktifi ekledikten sonra her 20 dakikada bir okutulup optimum aralık, verilen insülin standartlarına uygun olarak belirlenmiştir.

Plak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrede (BIO-TEK μ Quant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika) okutulmuştur.

3.10. Oksidatif Stres Ölçümü

Oksidatif stres biyobelirteci olan ROS miktarı DCFHDA testi ile lipid peroksidasyon sonucu oluşan malondialdehit miktarı ise TBARS testi ile ölçülmüştür.

DCFHDA testi için INS-1E pankreatik hücreleri kuyucuk başına 5×10^4 hücre olacak şekilde siyah plağa ekilmiştir. DCFHDA, serum ile etkileşime girdiğinden serumsuz besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra besiyeri atılmıştır. Serumsuz besiyerinde 0,25 μ M, 0,5 μ M ve 1 μ M neoeriositrin konsantrasyonları ve 1 μ M NAC konsantrasyonu olacak şekilde hazırlanmış ve INS-1E hücrelerine uygulanmıştır. 21 saat süre sonunda serum içeren besiyerinde hazırlanan serbest radikallerden biri olan 100 μ M konsantrasyonlu hidrojen peroksit uygulanarak negatif kontrol grubu oluşturulmuştur. Diyabet modeli için 5 mM STZ eklenmiş ve 3 saat etüvde inkübe edildikten sonra PBS ile yıkama yapılmıştır. DCFHDA (Sigma, D6883) boyası 10 μ M olacak şekilde her kuyucuğa eklenmiş ve 30 dakika boyanın hücre içine alınıp reaktif oksijen türlerini tutması için etüvde bırakılmıştır. Plak PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 485-535 nm dalga boyunda (EnSight Multimode Plate Okuyucu) ölçümleri yapılmıştır.

Oksidatif strese bağlı ortaya çıkan lipid peroksidasyonunu tespit etmek için TBARS yöntemiyle malondialdehit miktarı llmştir. Malondialdehit miktar ölçümü için INS-1E hücreleri 75 cm² hacimli filtreli flaskta üretilmiştir. Hücreler 25 cm² hacimli filtreli flakslara alınıp 24 saat inkübe edildikten sonra flask içerisindeki besiyeri atılmıştır.

0,25 M, 0,5 M ve 1 M neoeriositrin konsantrasyonu ve 1 M NAC olacak Şekilde hazırlanan besiyerleri her bir flaska 4 ml eklenmiştir. 21 saat etüvde inkübasyon sonunda 5 mM STZ 4 ml olacak Şekilde STZ ve flavonoid gruplarına eklenmiştir. 3 saat sonunda aşağıdaki iŐlemler sonrası lizatlar toplanmıştır.

1. Flask içerisinden besiyerleri 15 ml tüplere aktarılmıŐ ve kazıyıcı ile kazınan hücreler de uygun tüplere eklenmiştir.
2. Tüpler 1600 rcf 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj işleminde sonra süpernatant atılmış ve hücre peletine 250 l PBS eklenmiştir.
4. Mikrosantrifüj tüpünde 10000 rcf 4°C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra lizatlar toplanmıştır.

Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit lm TBARS kit (Cayman, Almanya, 10009055) yönergesine göre yapılmıştır.

1. Her grup için cam tüpler içerisine MDA standartları ve örneklerden 50 l koyulmuştur.
2. 50 l SDS solüsyonu üzerine eklenmiştir.
3. 2 ml renkli reagent her tüpe eklenmiştir.
4. Kaynar suyun içerisinde 1 saat inkübe edilmiştir.
5. Reaksiyonu durdurmak için buz dolu kaba yerleŐtirilerek 10 dakika soğuması beklenmiştir.
6. 10 dakika sonunda 1600 rcf x 4°C'de santrifüj edilmiştir.
7. Tüplerde oluşan bulanıklığın gitmesi için oda sıcaklığında 30 dakika beklenmiştir.
8. 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 150 l mikropipet ile dağıtıldıktan sonra ELISA okuyucuda 530-540 nm absorbans değerinde ölçüm yapılmıştır.

3.11. Protein Tayini

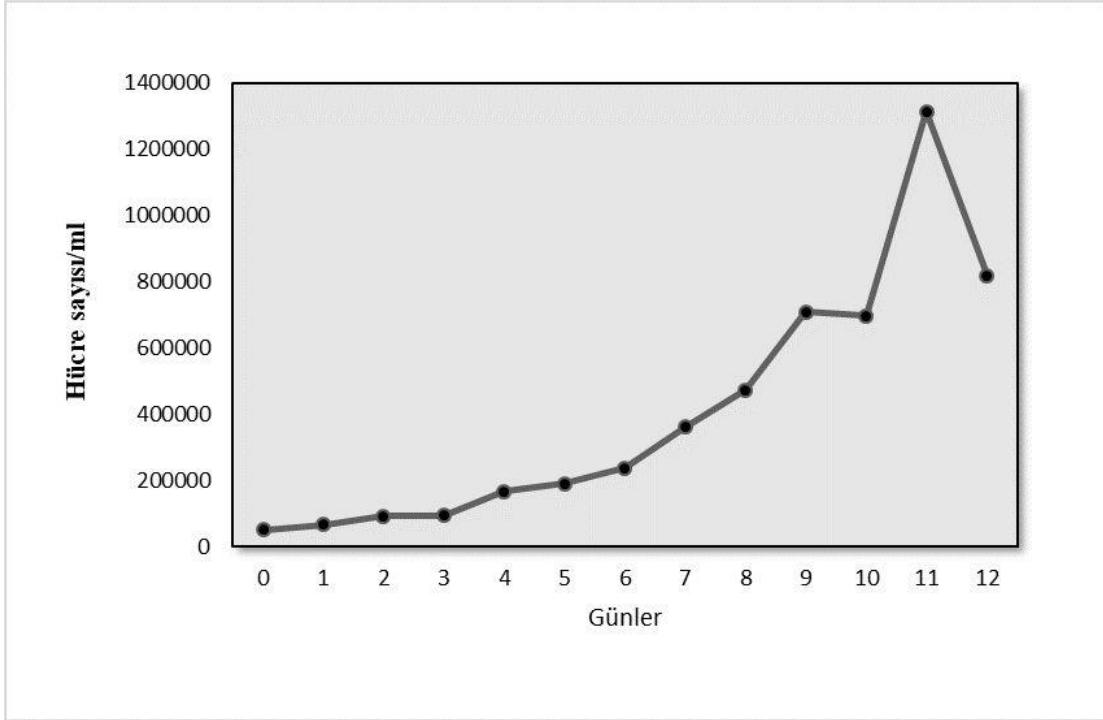
İnsülin ve malondialdehit testlerinde protein başına insülin ve malondialdehit miktarlarının hesaplanması için protein tayini yapılmıştır. Protein tayininde biskininonik aside (BCA) dayalı deterjan uyumlu bir formülasyon içeren kit kullanılmıştır. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılarak doğruluğu kolorimetrik ölçüm ile sağlanmıştır.

Total protein miktarını tayin etmek için Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225-23227) kullanılmıştır. Total protein miktarı sığır serum albümini kullanarak hazırlanan standart konsantrasyonlarına göre seyreltilerek 25 µl 96 kuyucuklu plağa aktarılmıştır. Hücre lizat örneklerinden 25 µl kuyucuklara aktarılmıştır. Plağa kit içeriğinde belirttiği şekilde çalışma solüsyonundan 1:8 oranının sağlanması için 200 µl eklenmiştir. Protein aktivitesini gösterebilmesi için 37°C stabil sıcaklıkta etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ELISA okuyucuda 560 nm dalga boyunda okutulmuştur.

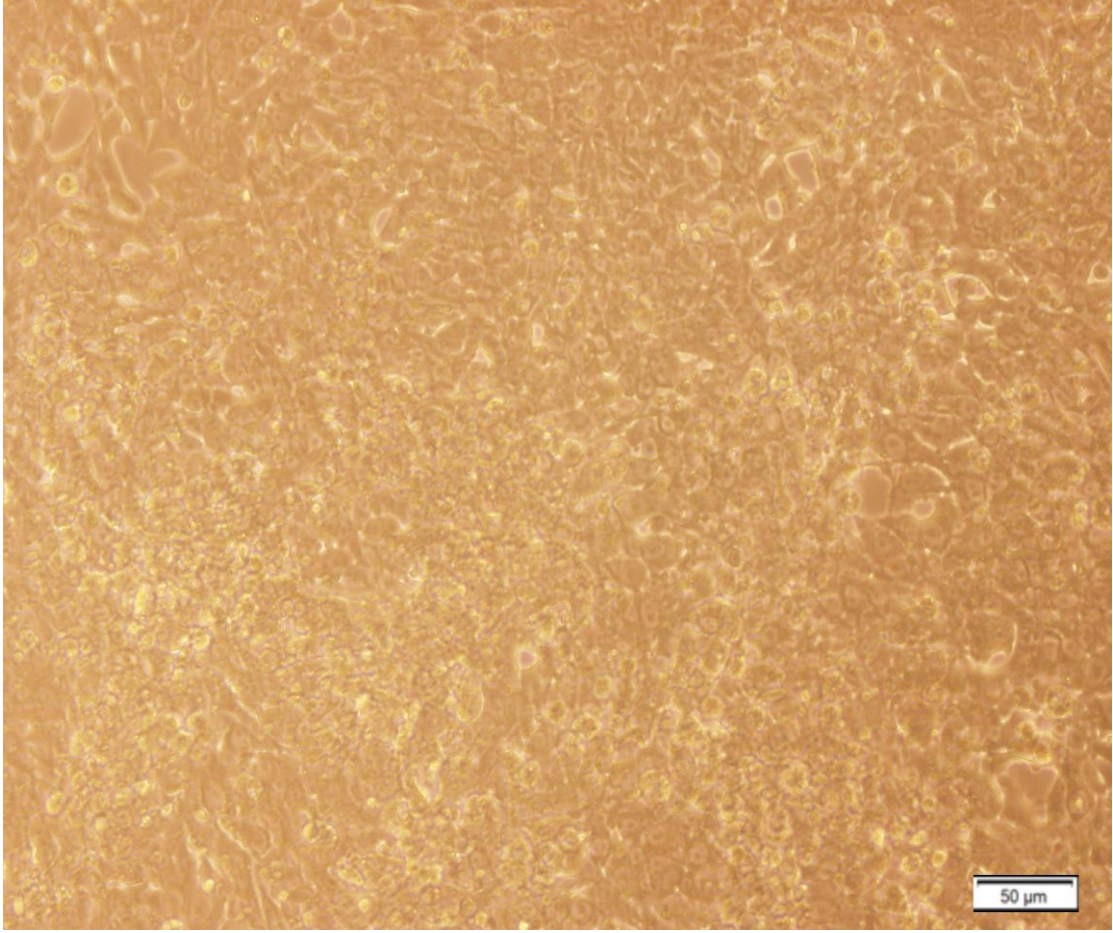
4. SONUÇLAR

4.1. Hücre İkileme Sonuçları

INS-1E hücrelerinin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi için hücre ikileme zamanı tespit edilmiştir. Bunun için hücreler başlangıç sayısı 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Toplamda on iki günlük bir yaşam döngüsü boyunca hesaplayıcı kullanarak yapılan hesapta hücrenin ikileme zamanı 55,6 saat olarak hesaplanmıştır [88]. En çok hücre potansiyeline 11. günde eriştiği bulunmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında bazı çalışmalarda pankreas hücreleri için STZ uygulaması hücre ekiminden 1 gün sonra yapılmıştır [69]. Ancak 1. Günde yapılan uygulama sonrasında hücrelerin yüzeye ve birbirlerine tam tutunamamasından dolayı hücrelerde sayısal bir kayıp yaşanmış ve işlevlerinde azalma tespit edilmiştir. Hücre üreme eğrisi, hücre ekiminin 2. gününde STZ uygulaması yapılarak hücrelerin karakteristik özelliklerini kaybetmemesi için önemli bir durum olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. INS-1E hücrelerinin üreme eğrisi

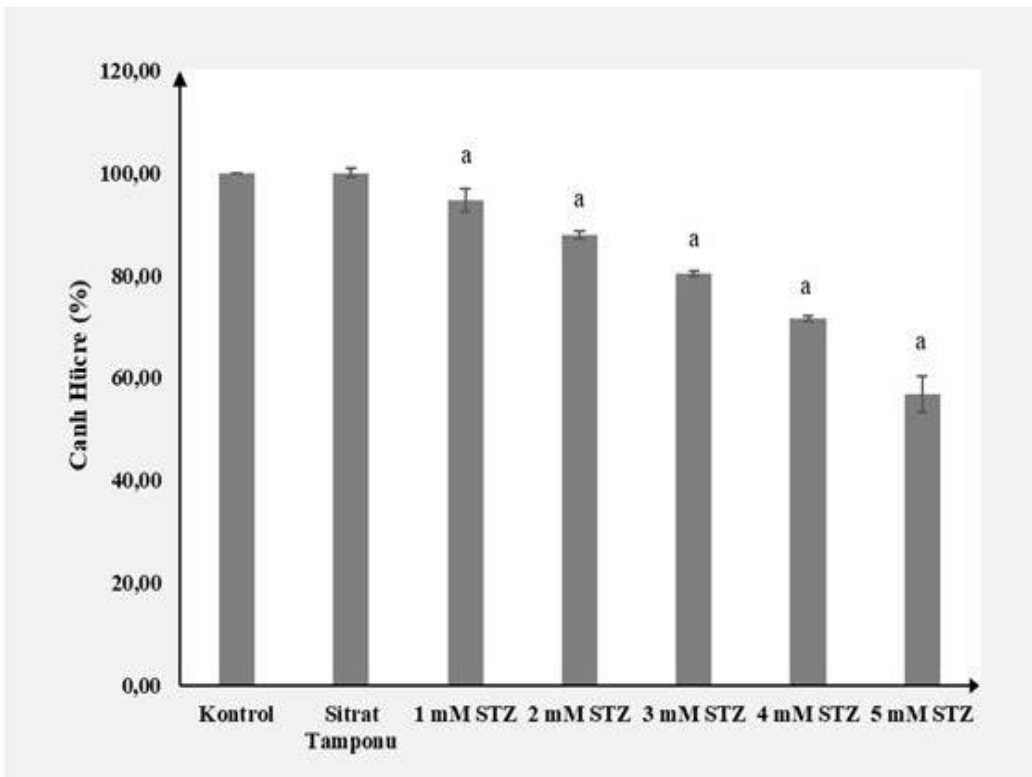


Şekil 4.2. INS-1E hücrelerinin 11. gün görüntüsü

Şekil 4.2.'de görüldüğü üzere INS-1E pankreas β hücreleri iğsi bir yapıda olup adherent hücre özelliği göstermektedir. En çok üreme 11. günde 13×10^5 hücre/ml sayısına ulaşarak hücre döngüsü süresinin oldukça uzun olduğu tespit edilmiştir. Bu durum INS-1E hücre hattının transforme hücre hattı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu sebeple hücrenin pasajlanma döngüsü yaklaşık 5-10 gün arasında yapılmıştır.

4.2. Streptozotosin ile Diyabet Modellemesi

INS-1E hücrelerine STZ uygulaması sonrasında hücre canlılık ölçümü kristal viyole testi ile yapılmıştır. INS-1E pankreas hücrelerinde STZ'nin LC₅₀ dozunu tespit etmek için hücreler 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM ve 5 mM STZ konsantrasyonları ile 3 saat süre boyunca etüvde inkübe edildikten sonra %50'ye yakın canlılık gösteren konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 4.3.). 5 mM STZ konsantrasyonunda %56,77 hücre canlılığı tespit edilmiş ve diyabet modeli oluşturmak için daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere bu konsantrasyon seçilmiştir.



Şekil 4.3. INS-1E hücrelerinde kristal viyole testi ile hücre canlılık sonuçları. a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p \leq 0,0002$)

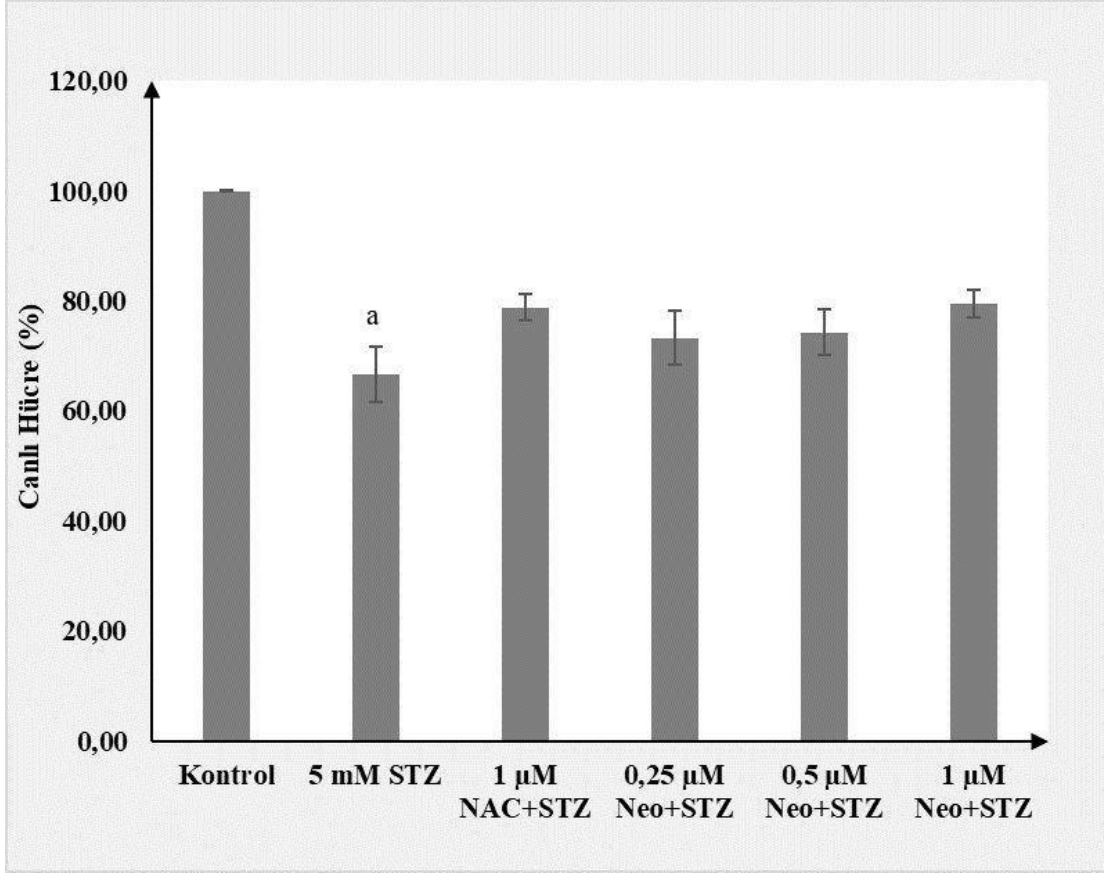
STZ'nin pankreas β hücrelerinde oksidatif stresi yoluyla diyabet modeli oluşturulması için 5 mM konsantrasyonu ve 3 saat inkübasyon saati seçilmiştir. Çeşitli çalışmalarda STZ saati ve konsantrasyonları değişiklik gösterebilir mevcut hücre ve ortam koşullarına göre modellemesi bu miktar ve saatte sağlanmıştır. STZ, hücre üzerinde düşük konsantrasyon ve kısa sürede apoptoza neden olurken, belirlenen dozların

konsantrasyonları ve süre arttırıldığında nekroz oluşumuna neden olur. Tez deneylerinde kısa süreli ve düşük konsantrasyonlu STZ grupları denenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında STZ'yi çözdürmek için kullanılan sitrat tamponunun toksik bir etki oluşturmadığı görülmektedir. Deneyde STZ'yi çözmek için kullanılan sitrat tamponu toksik bir etki yapmadığı ve kontrole arasında anlamlı bir fark olmadığından neoeriositrin ile yapılan testlerde sitrat tamponu grubu uygulaması yapılmamıştır.

4.3. Kristal Viyole Hücre Canlılık Test Sonuçları

Hücre canlılık testlerinden biri olan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) testinde serumun bazı flavonoidlerle etkileşim kurup sinerjik bir etkiye neden olduğu bildirilmiştir [89]. Bu çalışmada da çalışmanın başında MTT testi yapılmış ve tetrazolyum tuzları ile neoeriositrin flavonoidinin floresans okuyucuda etkileşime girerek ışımaya vermesi nedeniyle hücre olmadan da ELISA okuyucuda absorbans değerinin giderek arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmada MTT testi yerine bir başka canlılık testi olan kristal viyole kullanılmıştır. Neoeriositrinin kristal viyole boyasıyla bir etkileşimi olup olmadığını test etmek için hücre olmadan flavonoidin en yüksek dozu kristal viyole boyama yapıldığında boya ile etkileşime girmediği bulunmuştur. Özellikle STZ, DNA'yı oksidatif stres yoluyla hasara uğrattığı için bu yöntem seçilmiştir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak NAC kullanılmıştır. NAC antioksidan değeri belirlenmiş yüksek aktiviteli bir aminoasit olarak literatürde belirtilmektedir. Yapılan klinik araştırmalarda da NAC insülin duyarlılığını arttırmıştır. Ayrıca farelerde yapılan diyabet deneylerinde pankreas hücrelerini NAC antioksidanının koruyucu etkisi olduğunu ve insülin salgılanmasını arttırdığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [90].



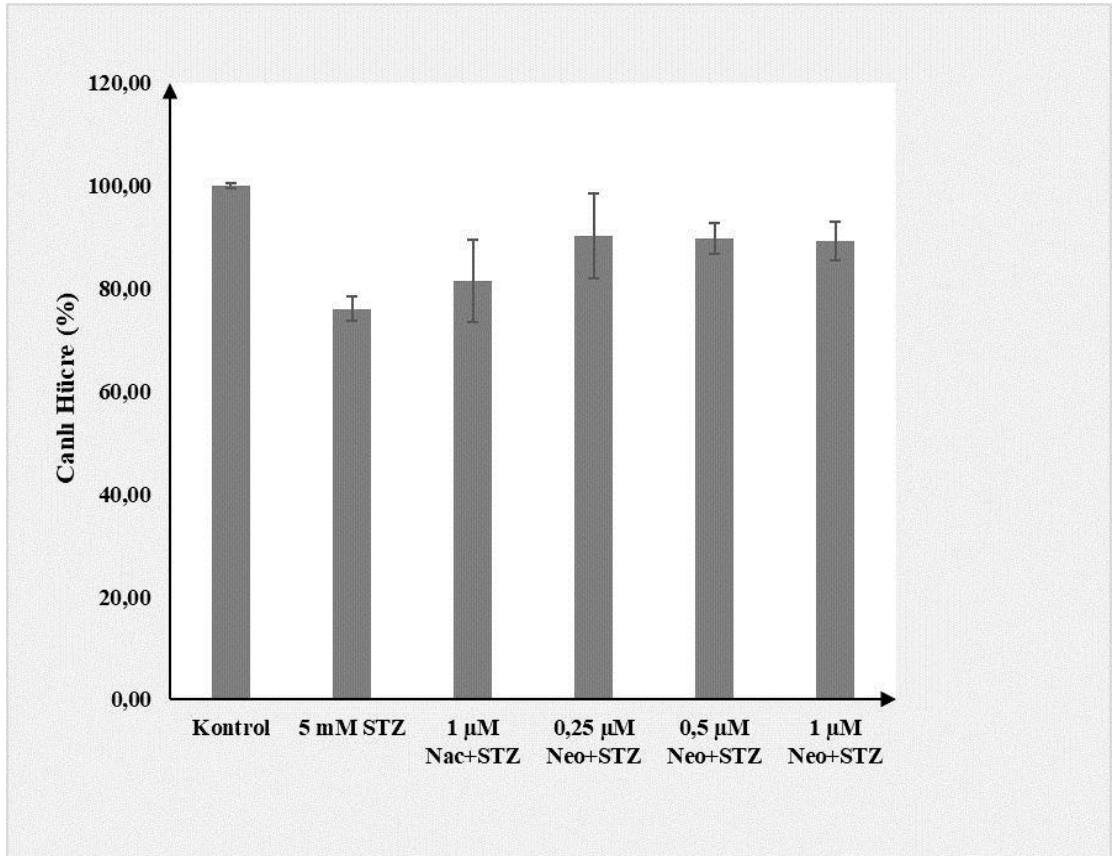
Şekil 4.4. INS-1E pankreas hücrelerinde neoeriositrinin farklı konsantrasyonlarının kristal viyole testi ile hücre canlılık sonuçları. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel fark ($p \leq 0,0002$).

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol ve DMSO grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığı için grafiklerde yer almamaktadır. Kontrol ile 5 mM STZ ile arasında $p \leq 0,0002$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmektedir. Bu anlamlı farklılık diyabet modellemesi için uygun konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.).

Pozitif kontrol olan NAC ile 1 µM neoeriositrin arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0,0002$) anlamlı bir fark görülmemekle birlikte INS-1E hücrelerinin canlılık yüzdelerine bakıldığında neoeriositrin uygulamasında %79,51 iken NAC uygulamasında %78,82 canlılık değeri ile neoeriositrinin NAC antioksidanına benzer bir koruyucu etki sağladığı bulunmuştur. Neoeriositrinin artan konsantrasyonları ile INS-1E hücrelerinin canlılık oranı doğru orantılı artmıştır.

4.4. Tripın Mavisi ile Canlılık Test Sonuçları

Bir diğer hücre canlılık testi olan tripan mavisi boyası ile neoeriositrinin koruyucu etkisi sayısal olarak hemositometre lamı kullanılarak ölçülmüştür. Canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Neoeriositrin konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre canlılığının değişmediği ancak, STZ grubuna göre hücre canlılığında artış tespit edilmiştir (şekil 4.5.).

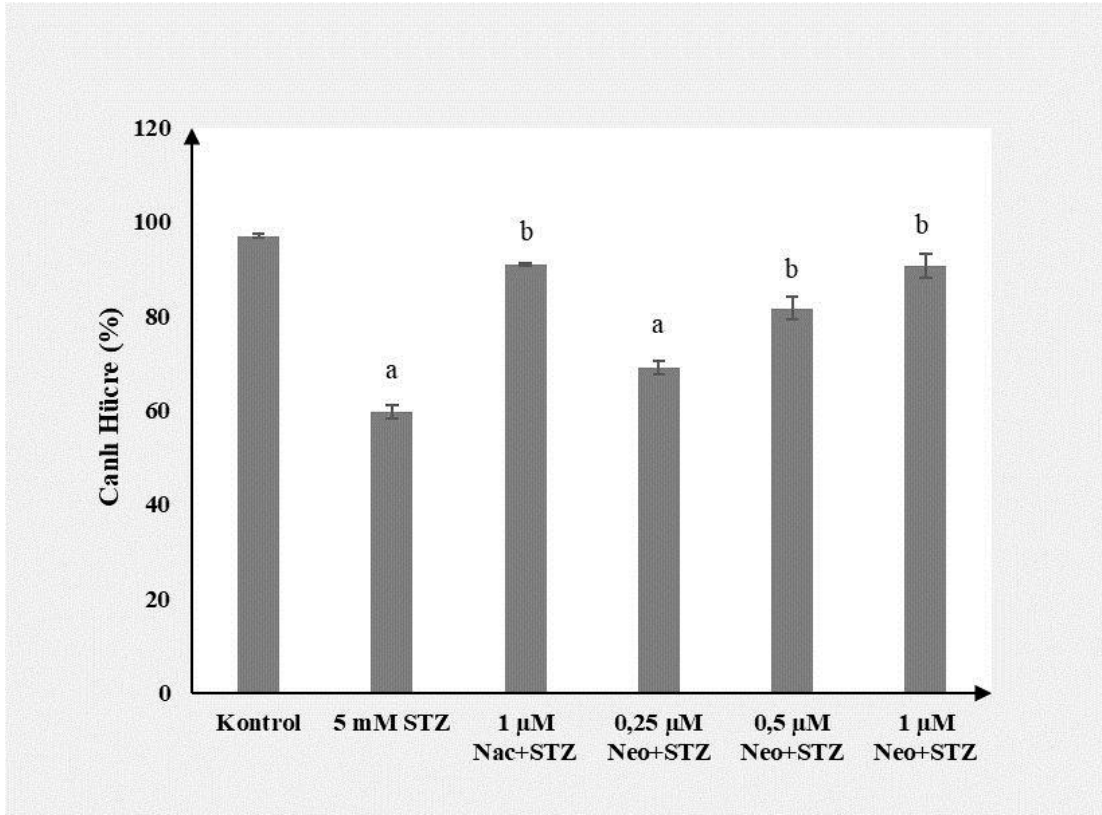


şekil 4.5. INS-1E pankreas hücrelerinde tripan mavisi boyama testi ile hücre canlılık sonuçları.

Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında neoeriositrinin benzer etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sayısal olarak hücre canlılığı yüzdesinde (şekil 4.5.) STZ grubu ile neoeriositrin uygulanan gruplar arasında hücre canlılığında fark görülmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak ($p \leq 0,05$) anlamlı bulunmamıştır.

4.5. Akridin Oranj/Propidyum İyodit Test Sonuçları

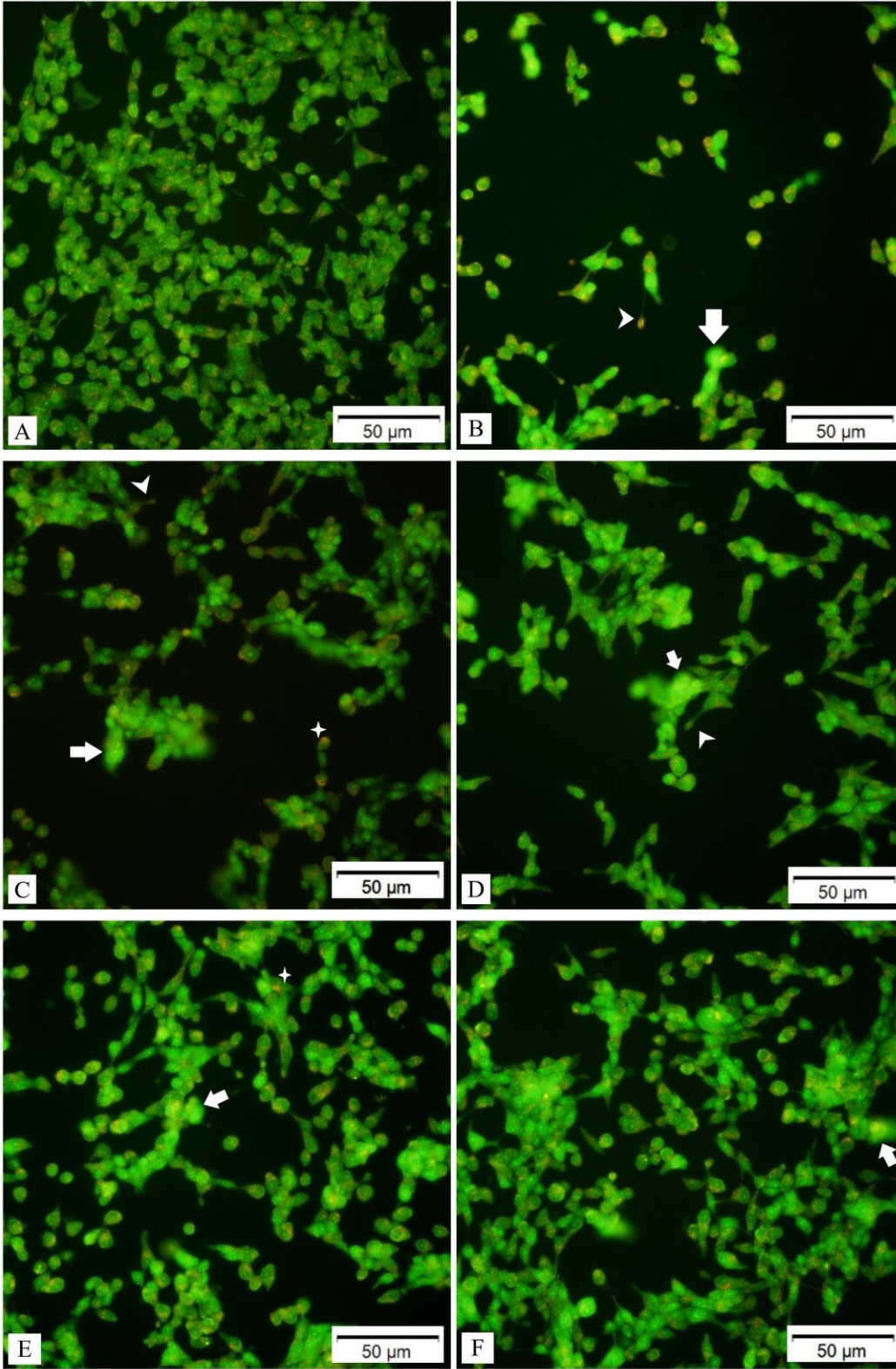
Diyabet modeli oluşturulan INS-1E pankreatik β hücrelerinde neoeriositrinin koruyucu etkisinin göstermek için hücre ölüm tipini belirlemede akridin oranj/propidyum iyodit floresan boyama yapılmış ve hücrelerin morfolojik özellikleri gösterilmiştir. Floresan mikroskobu ile çekilen fotoğraflar üzerinden canlı hücreler ve apoptotik hücreler değerlendirilerek sayım yapılmıştır. Bu sayım sonuçlarına göre canlı hücre %'leri hesaplanmıştır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. INS-1E hücrelerinde AO/PI floresan boyama testi ile hücre canlılık sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$), b: STZ grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$)

İstatistiksel olarak kontrol ile STZ grubu ve 0,25 μ M neoeriositrin grupları arasında $p \leq 0,05$ değerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür. STZ grubu ile 0,5 μ M neoeriositrin, 1 μ M neoeriositrin ve 1 μ M NAC grubu arasında ($p \leq 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir.

İstatistiksel ve görsel verilere dayanarak 0.5 ve 1 μM neoeriositrin ile STZ grubu arasında anlamlı bir fark bulunduğu için bu konsantrasyonlarda neoeriositrinin koruyucu etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.7. INS-1E hücrelerinin floresan mikroskopunda AO/PI floresan boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: STZ, C: NAC+STZ, D: 0,25 µM Neo+STZ, E: 0,5 µM Neo+STZ, F: 1 µM Neo+STZ

Apoptotik hücreler ➡ apoptotik cisimcikler ➤ erken nekroz ✦ ile gösterilmiştir.

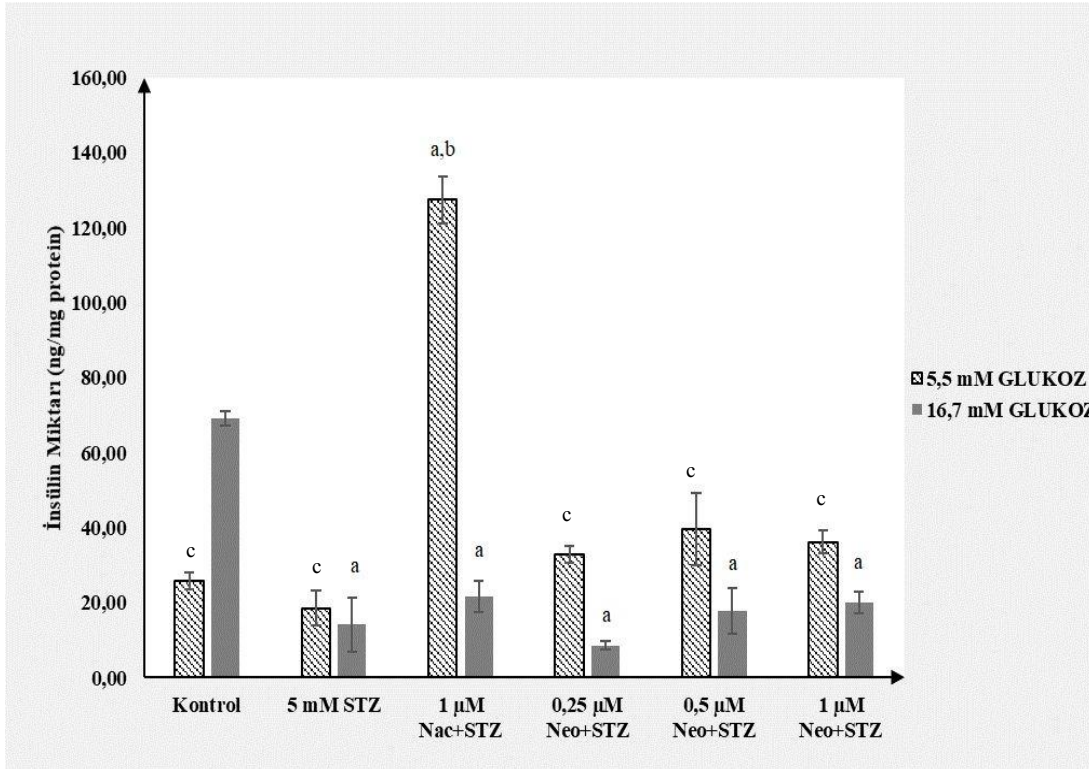
INS-1E pankreatik β hücrelerinde 5 mM STZ ile 3 saat inkübasyonu sonucu hücresel hasar oluştuğu gözlenmiştir. Hücreler apoptotik cisimcikler ve erken nekroz açısından karşılaştırıldığında apoptotik hücrelerin daha fazla miktarda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).

Morfolojik incelemede 1 μ M neoeriositrin ile 1 μ M NAC uygulanan hücrelerde hücre yapısı ve çekirdek bütünlüğünü koruması açısından benzerlik gözlenirken, yapılan % canlılık hesaplamasında 1 μ M NAC grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha yüksek çıkmıştır. STZ grubu ile 1 μ M neoeriositrin karşılaştırıldığında hücre sayısı bakımından 1 μ M neoeriositrin grubunda hücrelerin sayı bakımından kontrol ile yakın olduğu bulunmuştur.

Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere STZ grubuyla karşılaştırıldığında neoeriositrinin konsantrasyona bağlı olarak hücre bütünlüğü ve yapısında koruyuculuğunda artış görülmüştür.

4.6. Glukoz Uyarımlı İnsülin Miktar Ölçümü Sonuçları

INS-1E hücrelerinin 5,5 mM glukoz ve 16,7 mM glukoz koşullarında insülin cevabı şekil 4.8.'de verilmiştir. STZ uygulamasına bağlı olarak hücrelerin düşük ve yüksek glukoz koşullarında insülin cevabında kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiş, ancak yüksek glukoz koşullarında kontrolden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Neeriositrinin 0,5 μ M ve 1 μ M konsantrasyonlarında düşük ve yüksek glukoz koşulunda INS-1E hücrelerinin insülin cevabında STZ grubuna göre artış gözlenmiş, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Özellikle de düşük glukoz koşulunda pozitif kontrol grubu olan NAC grubu değeri diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür.

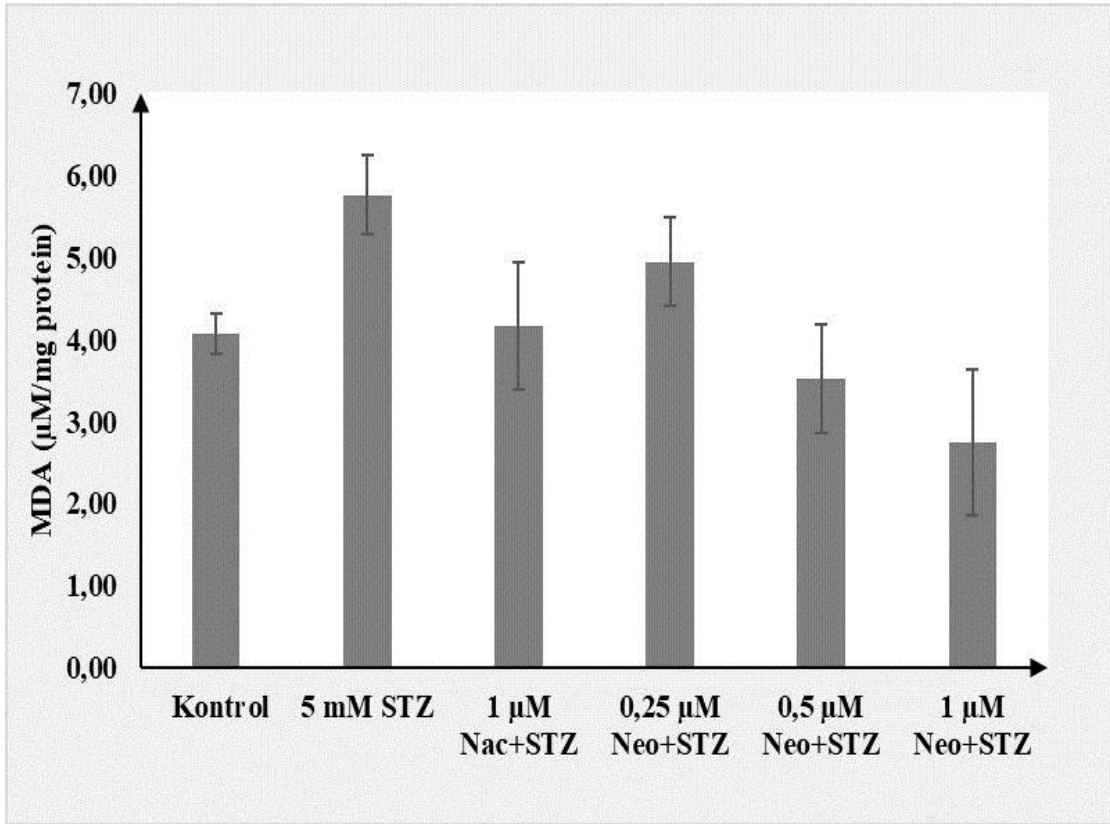


Şekil 4.8. INS-1E hücrelerinde glukoz miktarına göre hücrelerin salgıladığı insülin miktarları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: STZ grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). c: NAC grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).

4.7. Oksidatif Stres Ölçümü Test Sonuçları

Tez çalışması kapsamında oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidasyonun biyobelirteci olan malondialdehit miktarı TBARS ölçümüyle tespit edilmiştir (Şekil 4.9.). MDA miktarının neoeriositrin gruplarında STZ grubuna göre düşük olduğu bulunmuş ise de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Neoeriositrin konsantrasyonundaki artış ile malondialdehitin doğru orantılı azaldığı bulunmuştur. Pozitif kontrol NAC grubu ile neoeriositrin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuyla karşılaştırıldığında STZ grubunda malondialdehit miktarında artış olması diyabet modeli oluşturulduğunu göstermektedir. 0,5 μM ve 1 μM neoeriositrin uygulanan gruplarda kontrol grubuna yakın bir MDA miktarı ölçülmüştür. STZ grubu ile karşılaştırıldığında ise artan dozlardaki neoeriositrin miktarıyla açığa çıkan malondialdehit miktarı azalmaktadır. Neoeriositrin konsantrasyona bağlı olarak MDA miktarında azalmaya neden olmuştur.

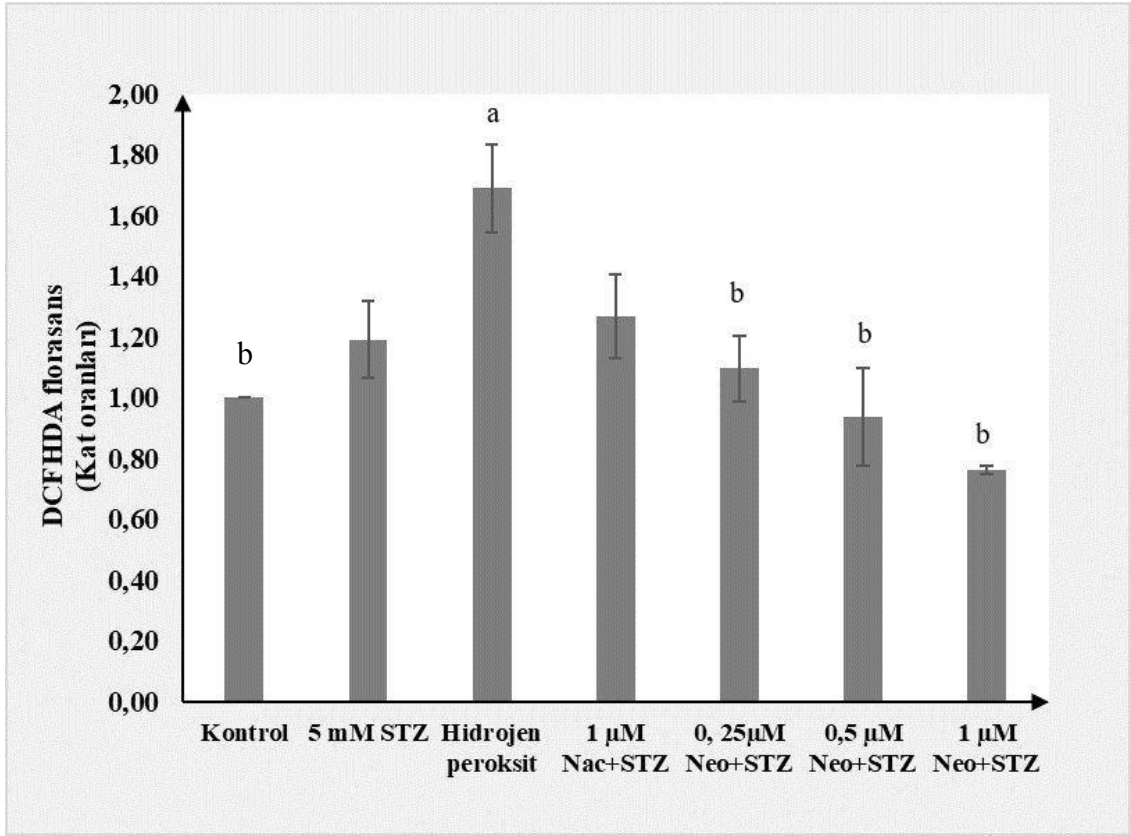


Şekil 4.9. INS-1E hücrelerinde lipid peroksidasyon ölçümü

Oksidatif stres belirteci olan ROS ölçüm sonuçları Şekil 4.10.'da verilmiştir. Hidrojen peroksit ile STZ grubu arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0,05$) anlamlı bir fark bulunmamıştır.

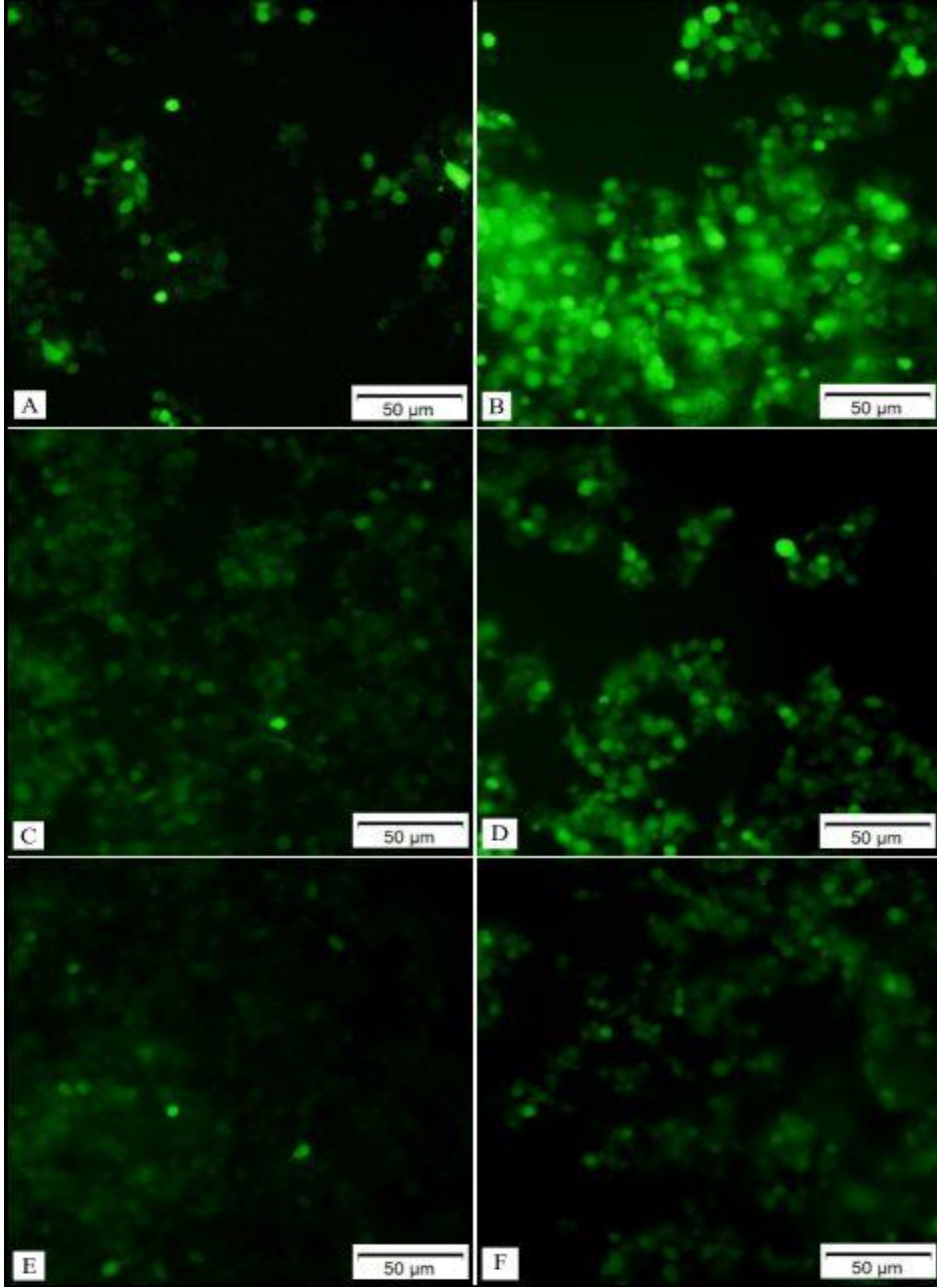
Bu durum hidrojen peroksit uygulamasındaki gibi STZ'nin ROS miktarını hücresel düzeyde arttırdığını göstermektedir. Şekil 4.10.'da görüldüğü üzere hidrojen peroksit ile kontrol, 0,25 μM Neo+STZ, 0,5 μM Neo+STZ ve 1 μM Neo+STZ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0,05$) bulunmuştur. STZ ile neoeriositrin konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da neoeriositrin uygulanan gruplarda bir azalma tespit edilmiştir. Hidrojen peroksit grubunun kontrol ve 0,5 μM neo+STZ, 1 μM neo+STZ grupları arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0,05$) anlamlı fark bulunmuştur. 0,5 μM ve 1 μM neoeriositrin gruplarının değerleri kontrol değerine yakın değer olması neoeriositrinin ROS'a karşı koruyuculuğunu göstermektedir.

Neoeriositrinin INS-1E pankreatik hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da konsantrasyona bağlı koruyucu etkiye sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.10. INS-1E pankreas hücrelerinde hücre içi ROS ölçüm sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: 50 μ M hidrojen peroksit grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$)

INS-1E pankreatik hücrelerinin DCFHDA boyama ile floresan görüntüleri şekil 4.11.'de verilmiştir. Floresan boyanma görüntülerine göre ROS miktarında azalma görülmektedir.



Şekil 4.11. INS-1E hücrelerinin DCFHDA boyama ile floresan görüntüleri. A: Kontrol, B: STZ, C: NAC+STZ, D: 0,25 μ M Neo+STZ, E: 0,5 μ M Neo+STZ, F: 1 μ M Neo+STZ

5. TARTIŞMA

Diyabet, dünyada yaklaşık 422 milyon hasta sayısı ile günümüzde metabolik hastalıklar içinde en yaygın olanıdır ve 2040 yılında bu sayının 640 milyona yükseleceği öngörülmektedir [1]. Bu durum göz önüne alındığında dünyada yaygın olan diyabetin tedavisi ve koruyucu önlemlerle ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekli olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında antioksidan ve antidiyabetik potansiyeli olabileceği düşünülen bir flavonoid olan neoeriositrinin koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Çağımızda beslenme alışkanlıklarının bozulması ve hareketsizlikle beraber dünyada sık görülen hastalıklardan biri olarak tip-2 diyabet hastalığı görülmektedir [1]. Bitkilerde bulunan antioksidan özelliği taşıyan flavonoidler, oksidatif stres kaynaklı pankreatik β hücre hasarının oluşmasını önleyici özellikleri ile son zamanlarda alternatif bir önlem ve çözüm yolu olarak görülmektedir [86]. Toplumların sosyoekonomik durumları metabolik hastalıklar ile ilişkilidir. Hareketsiz yaşam ve hazır işlenmiş gıdayı dayalı beslenen toplumlarda diyabet oranı artmaktadır. Tarım toplumlarında bitkilerden elde edilen fenolik özellik gösteren besinlerle tedaviler mevcuttur. Eğer toplumların bitkileri ve doğayı kendileri için tedavi edici veya önleyici kullanmasıyla pek çok hastalığın azaldığının görülebileceği bildirilmiştir [88].

Diyabet hastalığının hem tip-1 ve hem tip-2 çeşitleri için oksidatif stresin büyük bir rol oynadığı yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türleri, antioksidan enzim aktivite düzeylerinin inhibe olmasına ve lipid peroksit oluşumunun artmasına neden olurlar [65]. Normal fizyolojik koşullar altında ROS üretimi ile endojen antioksidanlar bir denge içindedir. Kalıcı ve yüksek seviyede ROS oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozarak proteinler, lipidler ve DNA gibi önemli biyolojik molekülleri etkileyerek hücre hasarına sebep olurlar [31].

Diyabet tedavisinde insülinin maliyetli olması ve oral antidiyabetik ilaçların yan etkileri dikkate alındığında daha güvenilir antidiyabetik ilaçlar araştırılmaktadır. Ayrıca ilaçların komplikasyonları nedeniyle daha güçlü ve etkili olabilecek doğal bitkisel bileşenler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır [91]. Pankreas hücresi insülin salgılanmasını gerçekleştirdiği için bunun üzerine birçok model geliştirilmiştir. Bunlar perfüze pankreas, bozulmamış izole pankreatik adacıklar, saflaştırılmış beta hücreleri ve insülin salgılayan beta hücresi hatlarıdır [92].

Tip-2 diyabeti kontrol altına almak için egzersiz ve diyet etkili olmasına rağmen uzun süreçte bu hastaların %90'ı glisemik kontrolü sağlayamamaktadır. Bu yüzden tip-2 diyabet hastalığının tedavisinde antihiperglisemik ilaçlara gerek duyulmaktadır [93]. Diyabet için kullanılan ilaçlar tek bir hedefe odaklanır ve kompleks patolojiyi çözümlene için yetersiz kalırlar. Bu yüzden diyabet, hiperlipidemi gibi çoklu sinyal yollarına etki eden hastalıklarda potansiyel alternatif olabilecek tedaviler olan flavonoidlerin kullanımı gündeme gelmiştir [15].

Her geçen gün görülme sıklığı artış gösteren diyabet hastalığının tedavisi ve koruyucu tedbirlerle ilgili arayışlar sürmekte ve bu konuyla ilgili çalışmalar üzerine odaklanıldığı görülmektedir. Diyabet modeli oluşturularak yapılan *in vitro* çalışmalarla potansiyel antidiyabetik maddeler araştırılmaktadır. Günümüzde dünyada yaygın görülen bir metabolik hastalık olan diyabet için ilaç kullanımının yanı sıra alternatif olarak bitkisel kökenli antidiyabetik özellik taşıyan ürünler de diyabet tedavisinde kullanılmaktadır. Antidiyabetik özelliği bilinen bitkisel gıda ve bileşenlerin kullanılması sonucu olumlu etkilerin olması ve güvenilirliğinin bilimsel araştırmalarla desteklenmesiyle yeni potansiyel ajanlar hakkında çalışmalar yapılmaktadır [62]. Flavonoidlerin çeşitli türlerinin antiinflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik etkileri bilinmektedir. Pankreas beta hücre hasarı tip-2 diyabet hastalığında önemli bir etkidir. Hasarın en büyük sebebinin oksidatif stres olduğu belirtilmektedir [94].

Özellikle beslenme düzeninin bozulması, hareketsizliğe bağlı olarak obezite ve diyabet tanısı konulan hasta kişilerin sayısı giderek artmaktadır. Metabolik bir hastalık olan diyabet pek çok organ ve fizyolojik işlevi etkilemekle birlikte diğer metabolik hastalıkları da tetiklemektedir. Bir hastalığa yakalanmadan tedavi etmek, kişi vücudunun hasarlara karşı önlem alınması diğer organlarında en az zararla atlatılabilmesi için hastalık ortaya çıkmadan önlenmesi öncelikli tedavilerden biridir.

Bu tez çalışmasında flavonoidlerin antioksidan ve antidiyabetik özellikleri dikkate alınarak çoğunlukla turunçgil meyvelerinde bulunan neoeriositrin flavonoidinin INS-1E pankreatik beta hücrelerinde antidiyabetik ve antioksidan özelliği araştırılmıştır. Çalışmada neoeriositrinin potansiyel koruyucu etkisi hücre canlılık testleri, oksidatif stres parametreleri, hücre ölüm tipi ve insülin salgılanması testleri ile incelenmiştir.

STZ ile diyabetik model oluşturulan ve flavonoidlerin iyileştirici etkilerinin çalışıldığı çok sayıda *in vivo* çalışma literatürde yer almaktadır [69,73,75]. Diyabet çalışmalarında pankreas hücrelerinin izole edilip insülin salgılama özelliklerinin korunması oldukça zor olduğu için *in vitro* çalışmalar literatürde daha az bulunmaktadır. Bir hastalığın tedavi edilebilmesi için öncelikle hastalığın temelinde yatan mekanizmanın bilinmesi gereklidir. Hem canlı organizmaların kullanımının en aza indirilmesi hem de hücre içi mekanizma çalışmaları için hücre kültürü çalışmaları tercih edilmektedir. Citrus grubu meyvelerde ve bazı bitkilerde bulunan fenolik bir bileşik olan neoeriositrin flavonoidiyle ilgili sınırlı çalışma vardır. Antidiyabetik ve antioksidan etkisiyle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Neoeriositrinin hücre üzerindeki antidiyabetik ve antioksidan etkisi ilk defa bu tezde çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında neoeriositrinin antioksidan ve antidiyabetik etkisi farklı hücre canlılık testi ile değerlendirilmiştir. Kristal viyole testi DNA hasarına göre hücre canlılığının tespit edilmesine dayalı bir testtir [95]. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen hücre canlılık testleri birbiriyle ve kendi içlerinde tutarlı sonuçlar vermiştir. Bu veriler AO/PI floresan boyama ile desteklenmiştir.

Çalışmada kristal viyole boyama testinde diyabet modeli oluşturulan INS-1E hücrelerinde neoeriositrin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak hücre canlılığında artış gözlenmiştir. STZ uygulamasının neden olduğu hücre canlılığındaki azalma neoeriositrin uygulamasıyla neoeriositrin konsantrasyonuna bağlı artış göstermiş ve en yüksek konsantrasyon olan 1 μ M grubunda pozitif kontrol grubu olan NAC seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Kristal viyole canlılık testi sonuçlarına göre neoeriositrinin hücre canlılığında koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Morecea ailesinden soğan ve elmada bulunan bir flavonoid olan morin'in araştırıldığı çalışmada INS-1E hücrelerinde STZ kullanarak diyabet oluşturulmuştur. Morin flavonoidinin koruyucu özelliği çeşitli hücre canlılık ve oksidatif stres testleri uygulanarak ölçülmüştür [75]. Tez çalışmasında kristal viyole testiyle elde edilen hücre canlılık sonuçları, koruyucu özellik gösteren bir flavonoid olan morinin antioksidan etkisiyle karşılaştırıldığında morinin en yüksek konsantrasyonu olan 10 μ M ile neoeriositrinin 1 μ M konsantrasyonunun yaklaşık aynı oranda koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Tripan mavisi testi ile hücre canlılığı kantitatif olarak hemositometre lamında hücre sayımı yapılarak değerlendirilmiştir. Tripan mavisi boyama testi ile yapılan hücre canlılığına bakıldığında STZ grubunda canlı hücre değeri olması geri döndürülemeyecek yani nekrotik hücre ölümlerini göstermesi ile açıklanabilir. Çalışmada tripan mavisi boyama sonuçlarına göre neoeriositrin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Neoeriositrin uygulama grupları NAC grubu ve STZ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemekle birlikte hücre canlılığının hem STZ hem de NAC grubuna göre artış gösterdiği bulunmuştur. Dolayısıyla neoeriositrin gruplarında hücre canlılığındaki artış, STZ'nin neden olduğu hücre canlılığındaki azalmada neoeriositrinin koruyucu etkisini işaret etmektedir.

Hücre ölüm tipinin belirlenmesinde akridin oranj/propidyum iyodit testi yapılmıştır. Apoptoz pek çok sinyal ile hücrenel veya çevresel olarak tetiklenebilir. Apoptoz çekirdek parçalanması, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimcikler gibi hücrenel değişimler ile karakterize iken, nekroz hücre zarı hasarı ile karakterize edilmektedir. Çalışmada INS-1E pankreas β hücrelerinde ikili floresan boyama ile apoptotik ve nekrotik hücreler ile canlı hücrelerin sayımı yapılarak yüzdeleri hesaplanmıştır. AO/PI boyama ile hücre canlılıklarına bakıldığında neoeriositrinin 0,5 μM ve 1 μM konsantrasyonlarında STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. AO/PI sonuçları diğer hücre canlılık testleriyle elde edilen sonuçları desteklemiştir.

Benzer deney tasarımı ile yapılan bir çalışmada INS-1 hücrelerinde STZ ile diyabet modeli oluşturularak daphnetin flavonoidinin antioksidan etkisi araştırılarak hücre ölüm tipini belirlemek için akridin oranj/etidyum bromür floresan boyaması yapılmıştır [58]. Propidyum iyodit ve etidyum bromür temelde aynı özellikleri gösteren floresan boyalardır. Daphnetin ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar mevcut çalışmanın sonuçları ile karşılaştırıldığında 20-40 μM daphnetin ile 1 μM neoeriositrinin benzer koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Çalışmada STZ uygulamasında yüzey alanında hücre sayısının kontrole göre azaldığı tespit edilmiş ve bu durum nekroz ile ölen hücrelerin arasındaki bağlantıları kaybetmesi ve boyama esnasında ölü oldukları için plaktan dökülmesiyle açıklanabilir. 1 μM neoeriositrin uygulama grubundaki hücrelerde hücrelerin yapısal morfolojisi ve çekirdek bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Neoeriositrinin 1 μM konsantrasyonu ile NAC uygulama grubu AO/PI

floresan boyama ile morfolojik açıdan incelendiğinde, neoeriositrinin hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi hücre ölümünün azalması ile gözlenmiş ve neoeriositrinin antioksidan olarak koruyucu etkisinin NAC seviyesinde olduğu tespit edilmiştir.

INS-1E hücrelerinin düşük ve yüksek glukoz koşullarında insülin cevabı sonuçlarına bakıldığında neoeriositrinin STZ grubuna göre bir artışa neden olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Neoeriositrin uygulanan hücrelerin yüksek glukoz koşulunda insülin cevabı pozitif kontrol NAC grubu değerine yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar neoeriositrinin antioksidan etkisi bilinen NAC seviyesinde bir etkiye sahip olduğunu ancak, glukoz seviyesindeki artışa bağlı olarak insülin salımında bir artışa sebep olmadığını göstermiştir. Ancak mevcut verilerle neoeriositrinin insülin cevabında istatistiksel olarak anlamlı olmayan seviyede artışa neden olmakla birlikte antidiyabetik etki için yeterli olduğu söylenemez.

Çalışmada hücre içi oksidatif stres biyobelirteci olan ROS miktarı DCFHDA testiyle belirlenmiştir. STZ ile indüklenen ROS üretimi neoeriositrin uygulamasıyla konsantrasyona bağlı bir azalma göstermiştir. Neoeriositrinin ROS miktarını azaltma etkisi oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu ortaya koymuş ve ROS üzerindeki antioksidan etkisi yapılan hücre canlılık testleriyle tutarlılık göstermiştir. Fareden elde edilen pankreas β hücre hattı olan RINm5F hücreleriyle yapılan bir çalışmada STZ ile diyabetik model oluşturulmuş ve apigenin flavonoidinin antioksidan ve antidiyabetik etkisi araştırılmıştır [69]. Bu çalışmada apigenin flavonoidinin ROS miktarını önemli derecede azalttığı floresan mikroskobu görüntüleriyle gösterilmiştir. Apigenin en etkili olduğu konsantrasyon miktarı 5 μM iken çalışmamızda neoeriositrinin 1 μM konsantrasyonu ROS miktarını önemli derecede azaltarak koruyucu etki göstermiştir.

Kakaoda bulunan bir flavonoid olan epikateşin ve INS-1E hücreleriyle yapılan oksidatif stresten koruyuculuğunun araştırıldığı bir başka çalışmada 10 μM epikateşinin antioksidan etkiye sahip olduğu tespit edilmiş ve flavonoid uygulanan grubun ROS miktarının kontrol grubu değerlerinde olduğu bildirilmiştir [96]. Çalışmadan elde edilen ROS sonuçlarımıza göre 0,25, 0,5 ve 1 μM neoeriositrinin INS-1E pankreatik β hücrelerinde oksidatif stresten koruyucu etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

RINm5F hücre hattında STZ ile diyabet modeli oluşturulan bir başka çalışmada, algden elde edilen ve tanin türü olan oktafloretol A (OPA)'nın diyabet üzerine koruyucu

özelliği incelenmiştir. TBARS miktarının hücre içerisinde artması bu durumda belirleyici faktör olarak ölçüldüğünde OPA miktarı arttıkça TBARS miktarı azalmıştır. Bu tez çalışmasında da neoeriositrin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak aynı şekilde TBARS miktarı azalmıştır [70].

Sonuç olarak tez çalışması kapsamında yapılan hücre canlılık testleri, oksidatif stres ölçümleri ve hücre ölüm tipi boyamalarından elde edilen sonuçlara göre neoeriositrinin INS-1E pankreatik beta hücrelerinde STZ ile indüklenen oksidatif strese ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Son yıllarda bulunmuş bir flavonoid olarak neoeriositrinin antioksidan etkisiyle diyabete karşı potansiyel aday bir ajan olabileceğini ileri sürebiliriz. Bu tez çalışması kapsamında hakkında fazla bilgi bulunmayan neoeriositrin flavonoidi hakkında ilk veriler elde edilmiştir ve bu konuda yapılacak çalışmalar için kaynak oluşturacaktır.

6. YORUM

Bitkisel kaynaklı çeşitli flavonoidlerin antioksidan etkileri bilinmekle birlikte yenilerde keşfedilen bir flavonoid olan neoeriositrin hakkında henüz fazla bilgi yoktur. Tez kapsamında neoeriositrinin INS-1E hücrelerinde antioksidan özelliği ilk kez tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada neoeriositrinin INS-1E pankreatik beta hücrelerinde koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Metabolik hastalıklar için önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu tezde neoeriositrinin potansiyel antioksidan etkisinin belirlenmesi özgün değerini oluşturmaktadır. Neoeriositrin bazı bitkilerin meyve özütlerinde ve meyve sularında farklı miktarlarda bulunmakta ve flavonoid karışımları şeklinde uygulamaların yapıldığı çalışmalar olmakla birlikte neoeriositrinin tek başına antioksidan etkisiyle ilgili çalışma bu tez kapsamında yapılmıştır.

Neoeriositrin flavonoidi diyabet modelinde pankreatik beta hücrelerinde hasarı oldukça azaltmıştır. Çalışmada antioksidan etkisi bilinen NAC uygulamasıyla karşılaştırılarak neoeriositrinin INS-1E pankreatik hücrelerinde oksidatif strese karşı kristal violet canlılık testi ile DNA koruyucu etkisini gösterilmiştir.

Tripan mavisi boyama hücre sayımı yapılarak hücre sayısında bir artış sağladığı tespit edilmiştir. Akridin oranj/propidyum iyodit floresan görüntüleme ile apoptotik ve nekrotik hücreler tespit edilmiş ve neoeriositrinin konsantrasyonunda artışı bağlı olarak apoptotik hücrelerin azaldığı ve hücre sel bütünlüğün korunduğu bulunmuştur.

INS-1E pankreas β hücrelerinde neoeriositrinin düşük ve yüksek glukoz koşullarında insülin cevabında koruyucu bir etki tespit edilmemiştir.

INS-1E pankreas β hücre için ROS miktarının STZ grubuna göre neoeriositrin uygulamasıyla konsantrasyona bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Neoeriositrinin artan konsantrasyonlarında ROS oluşumunun azalması neoeriositrinin antioksidan kapasitesini ortaya koymuştur.

Çalışmada artan neoeriositrin konsantrasyonuna bağlı olarak MDA miktarında azalma tespit edilmiştir. MDA miktarındaki azalma da neoeriositrinin oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu desteklemektedir.

In vitro tip-2 diyabet modellemesi yapılan çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre neoeriositrin INS-1E pankreas β hücrelerinde apoptoz aracılı hücre ölümünü azaltmıştır.

In vitro koşullarda antidiyabetik etkilerinin belirlenmesi sonucunda elde edilecek verilerin daha sonra yapılacak hayvan çalışmalarına öncülük edeceği düşünölmektedir. Ayrıca hayvan çalışmaları sonrasında insölin direnci görölen bireylerde klinik çalışmalarla neoeriositrinin saf halinin toksik olmayacak düzeyde miktarı belirlenerek tip-2 diyabete karşı koruyucu olarak destekleyici hale getirilebilir.

Günümüzde dünyada oldukça yaygın olan diyabet hastalığının ve birçok oksidatif stres kaynaklı hastalıkta uygun miktarda flavonoid kullanımıyla bu hastalıklarda neoeriositrinin koruyucu etkiye sahip olabileceğini söyleyebiliriz. Sonuç olarak insanların beslenme alışkanlıklarını düzenlemesi ile oksidatif stres kaynaklı diyabet hastalığı için koruyuculuk sağlanabilir. Bu tez çalışmasıyla neoeriositrin flavonoidinin hücre üzerinde potansiyel bir antioksidan fitokimyasal olabileceği yönünde ilk veriler elde edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- [1] GLOBAL REPORT ON DIABETES WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global report on diabetes, 2016. http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html (accessed May 25, 2019).
- [2] A. Astrup, N. Finer, Redefining type 2 diabetes: “diabesity” or “obesity dependent diabetes mellitus”?, *Obes. Rev.* 1 (2000) 57–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119987> (accessed November 4, 2018).
- [3] N. Risk Factor Collaboration, Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)*, (2016). doi:10.1016/S0140-6736(16)00618-8.
- [4] P. Velayutham, A. Babu, D. Liu, E.R. Gilbert, ScienceDirect Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 1777–1789. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.06.003.
- [5] J. Philippe, D. Raccah, Treating type 2 diabetes: How safe are current therapeutic agents?, *Int. J. Clin. Pract.* 63 (2009) 321–332. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01980.x.
- [6] G. Drews, P. Krippeit-Drews, M. Duifer, Oxidative stress and beta-cell dysfunction, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* (2010). doi:10.1007/s00424-010-0862-9.
- [7] A. Castell, I. Baiges, A. Ard, Bioactivity of Flavonoids on Cells, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7 (2008) 299–308.
- [8] N.G. Forouhi, N.J. Wareham, Epidemiology of diabetes, *Med. (United Kingdom)*. 47 (2019) 22–27. doi:10.1016/j.mpmed.2018.10.004.
- [9] R.S. Yalow, S.A. Berson, Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *Obes. Res.* 4 (1996) 583–600. doi:10.1002/j.1550-8528.1996.tb00274.x.
- [10] R. Kahn, Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care.* 20 (1997) 1183–1197. doi:10.1002/joc.1524.
- [11] The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at

ERASMUS UNIVERSITY on September 20, 2013. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1992 Massachusetts Medical Society. All rights reserved., (1992).

- [12] M. Cnop, N. Welsh, J. Jonas, A. Jo, S. Lenzen, Mechanism of pancreatic b-cell death in type 1 and 2 diabetes, *Diabetes*. 54 (2005) S97–S107. doi:10.2337/DIABETES.54.SUPPL_2.S97.
- [13] J.-W. Yoon, H.-S. Jun, Autoimmune Destruction of Pancreatic β Cells : American Journal of Therapeutics, *Am. J. Ther.* 591 (2005) 580–591. http://journals.lww.com/americantherapeutics/Abstract/2005/11000/Autoimmune_Destruction_of_Pancreatic___Cells.15.aspx.
- [14] L.-J. Yang, Big Mac Attack: Does It Play a Direct Role for Monocytes/Macrophages in Type 1 Diabetes?, (2008). doi:10.2337/db08-1007.
- [15] S.Y. Tan, J.L. Mei Wong, Y.J. Sim, S.S. Wong, S.A. Mohamed Elhassan, S.H. Tan, G.P. Ling Lim, N.W. Rong Tay, N.C. Annan, S.K. Bhattamisra, M. Candasamy, Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention, *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 13 (2019) 364–372. doi:10.1016/j.dsx.2018.10.008.
- [16] T.A. Buchanan, Pancreatic beta-cell loss and preservation in type 2 diabetes, *Clin. Ther.* 25 (2003). doi:10.1016/S0149-2918(03)80241-2.
- [17] G.I. Bell, K.S. Polonsky, DM genetics beta cell function *NATURE*, (2001).
- [18] R.P. Robertson, Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity of Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes, *JBC Papers in Press*, 2004. <http://www.jbc.org/> (accessed December 10, 2018).
- [19] S.E. Kahn, CLINICAL REVIEW 135 The Importance of-Cell Failure in the Development and Progression of Type 2 Diabetes, 2001. <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/86/9/4047/2848331> (accessed June 9, 2020).
- [20] D.M. Muoio, C.B. Newgard, Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 193–205. doi:10.1038/nrm2327.
- [21] J.C. Henquin, M.A. Ravier, M. Nenquin, J.C. Jonas, P. Gilon, Hierarchy of the β

- β β β -cell signals controlling insulin secretion, 2003. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2362.2003.01207.x> (accessed April 28, 2019).
- [22] P.E. MacDonald, X. Wang, F. Xia, W. El-kholy, E.D. Targonsky, R.G. Tsushima, M.B. Wheeler, Antagonism of Rat-Cell Voltage-dependent K Currents by Exendin 4 Requires Dual Activation of the cAMP/Protein Kinase A and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathways*, (2003). doi:10.1074/jbc.M307612200.
- [23] P.A. Halban, K.S. Polonsky, D.W. Bowden, M.A. Hawkins, C. Ling, K.J. Mather, A.C. Powers, C.J. Rhodes, L. Sussel, G.C. Weir, β -Cell failure in type 2 diabetes: Postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 1983–1992. doi:10.1210/jc.2014-1425.
- [24] S. Dinneen, J. Gerich, R. Rizza, Carbohydrate Metabolism in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 707–713. doi:10.1056/NEJM199209033271007.
- [25] Perspectives in Diabetes Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes, n.d. <https://pdfs.semanticscholar.org/edc0/0983aa7eefbc6d980a44d59c4f3a3093717b.pdf> (accessed May 25, 2019).
- [26] O. Özcan, H. Erdal, G. Çakırca, Z. Yönden, Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA, *J. Clin. Exp. Investig.* 6 (2015) 331–336. doi:10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545.
- [27] S. Sen, R. Chakraborty, C. Sridhar, Y.S.R. Reddy, B. De, FREE RADICALS, ANTIOXIDANTS, DISEASES AND PHYTOMEDICINES: CURRENT STATUS AND FUTURE PROSPECT, n.d. www.globalresearchonline.net (accessed June 9, 2019).
- [28] P. Newsholme, E.P. Haber, S.M. Hirabara, E.L.O. Rebelato, J. Procopio, D. Morgan, H.C. Oliveira-Emilio, A.R. Carpinelli, R. Curi, C.P. Newsholme, Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity, *J Physiol.* 583 (2007) 9–24. doi:10.1113/jphysiol.2007.135871.

- [29] S.W. Ryter, H.P. Kim, A. Hoetzel, J.W. Park, K. Nakahira, X. Wang, A.M.K. Choi, Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress, *Antioxid. Redox Signal.* 9 (2007) 49–89. doi:10.1089/ars.2007.9.49.
- [30] E. Cadenas, K.J.A. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us., *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 222–230. doi:10.1016/S0891-5849(00)00317-8.
- [31] K.K. Srivastava, R. Kumar, Stress, Oxidative Injury and Disease, (n.d.). doi:10.1007/s12291-014-0441-5.
- [32] E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488923/pdf/waoj-5-9.pdf> (accessed June 9, 2019).
- [33] L.-J. Yan, Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress, *J. Diabetes Res.* 2014 (2014) 1–11. doi:10.1155/2014/137919.
- [34] E. Araki, S. Ovadomari, M. Morlt, Impact of Endoplasmic Reticulum Stress Pathway on Pancreatic p-Cells and Diabetes Mellitus, 2003. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/153537020322801018> (accessed December 10, 2018).
- [35] A.E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza, P.C. Butler, Cell Deficit and Increased-Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes, n.d. <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/diabetes/52/1/102.full.pdf> (accessed July 29, 2019).
- [36] L. Farilla, A. Bulotta, B. Hirshberg, S.L. Calzi, N. Khoury, H. Noushmehr, C. Bertolotto, U. Di Mario, D.M. Harlan, R. Perfetti, Glucagon-Like Peptide 1 Inhibits Cell Apoptosis and Improves Glucose Responsiveness of Freshly Isolated Human Islets, (2003). doi:10.1210/en.2003-0323.
- [37] Y. Kajimoto, H. Kaneto, Role of Oxidative Stress in Pancreatic-Cell Dysfunction, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1011 (2004) 168–176. doi:10.1196/annals.1293.017.

- [38] K. Sakai, K. Matsumoto, T. Nishikawa, M. Suefuji, K. Nakamaru, Y. Hirashima, J. Kawashima, T. Shirotani, K. Ichinose, M. Brownlee, E. Araki, Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β -cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 216–222. doi:10.1016/S0006-291X(02)02832-2.
- [39] H. Kaneto, G. Xu, K.-H. Song, K. Suzuma, S. Bonner-Weir, A. Sharma, G.C. Weir, Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic-Cell Function through the Induction of Oxidative Stress*, (2001). doi:10.1074/jbc.M104115200.
- [40] B. Hellman, L.-A. Idahl, J. Sehlin, I.-B. T~iljedal, Influence of Anoxia on Glucose Metabolism in Pancreatic Islets: Lack of Correlation between Fructose-1,6-Diphosphate and Apparent Glycolytic Flux, n.d. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F01222098.pdf> (accessed August 3, 2019).
- [41] R.P. Robertson, Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes* Mechanisms of Hyperglycemia-induced Oxidative Stress, (2004). doi:10.1074/jbc.R400019200.
- [42] A. Merglen, S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C.B. Wollheim, P. Maechler, Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells, (2004). doi:10.1210/en.2003-1099.
- [43] E.U. Etuk, AGRICULTURE AND BIOLOGY JOURNAL OF NORTH AMERICA Animals models for studying diabetes mellitus, (2010). <http://www.scihub.org/ABJNA> (accessed August 3, 2019).
- [44] R.B. Weiss, Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity., *Cancer Treat. Rep.* 66 (1982) 427–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6277485> (accessed August 3, 2019).
- [45] N. Takasu, I. Komiya, T. Asawa, Y. Nagasawa, T. Yamada, Streptozocin- and Alloxan-Induced H₂O₂ Generation and DNA Fragmentation in Pancreatic Islets: H₂O₂ as Mediator for DNA Fragmentation, *Diabetes.* 40 (1991) 1141–1145. doi:10.2337/diab.40.9.1141.

- [46] T. Szkudelski, The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas, (n.d.). <http://www.biomed.cas.cz/physiolres/s.htm> *Physiol. Res.* 50:536-546, 2001 (accessed September 2, 2019).
- [47] K.S. Saini, C. Thompson, C.M. Winterford, N.I. Walker, D.P. Cameron, STREPTOZOTOCIN AT LOW DOSES INDUCES APOPTOSIS AND AT HIGH DOSES CAUSES NECROSIS IN A MURINE PANCREATIC B CELL LINE, *INS-1*, 1996. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/15216549600201422> (accessed August 3, 2019).
- [48] H. Dewangan, R.K. Tiwari, V. Sharma, S. Shankar Shukla, T. Satapathy, R. Pandey, Past and Future of in-vitro and in-vivo Animal Models for Diabetes: A Review, *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51 (n.d.) 2017. doi:10.5530/ijper.51.4s.79.
- [49] J.B. Harborne, C.A. Williams, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry.* 55 (2000) 481–504. doi:10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
- [50] A. Ghorbani, R. Rashidi, R. Shafiee-Nick, Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review, *Biomed. Pharmacother.* 111 (2019) 947–957. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.127.
- [51] Z. Bahadoran, P. Mirmiran, F. Azizi, Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review, 2013. doi:10.1186/2251-6581-12-43.
- [52] G.R. Beecher, Role of Flavonoids in the Diet Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake 1, 2003. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/133/10/3248S/4687599> (accessed July 15, 2019).
- [53] M. Nishiura, S. Kamiya, S. Esaki, F. Ito, Flavonoids in Citrus and Related Genera Part II. Isolation and Identification of Isonaringin and Neeriocitrin from Citrus, 1971. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1961/35/11/35_11_1683/_pdf/-char/en (accessed August 19, 2019).
- [54] X.L. Wang, N.L. Wang, Y. Zhang, H. Gao, W.Y. Pang, M.S. Wong, G. Zhang,

- L. Qin, X.S. Yao, Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 46–51. doi:10.1248/cpb.56.46.
- [55] L. Li, Z. Zeng, G. Cai, Comparison of neoeriocitrin and naringin on proliferation and osteogenic differentiation in MC3T3-E1, *Phytomedicine.* 18 (2011) 985–989. doi:10.1016/j.phymed.2011.03.002.
- [56] R. Tundis, M. Bonesi, V. Sicari, T.M. Pellicanò, M.C. Tenuta, M. Leporini, F. Menichini, M.R. Loizzo, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.: Chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activity via the inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes, *J. Funct. Foods.* 25 (2016) 477–485. doi:10.1016/j.jff.2016.06.034.
- [57] M.L. Calabrò, V. Galtieri, P. Cutroneo, S. Tommasini, P. Ficarra, R. Ficarra, Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in *Citrus bergamia* juice, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 349–363. doi:10.1016/S0731-7085(03)00585-5.
- [58] E. Janda, A. Lascalea, C. Martino, S. Ragusa, S. Nucera, R. Walker, S. Gratteri, V. Mollace, Molecular mechanisms of lipid- and glucose-lowering activities of bergamot flavonoids, *PharmaNutrition.* 4 (2016) S8–S18. doi:10.1016/J.PHANU.2016.05.001.
- [59] M. Gabriele, S. Frassinetti, L. Caltavuturo, L. Montero, G. Dinelli, V. Longo, D. Di Gioia, L. Pucci, *Citrus bergamia* powder: Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties, *J. Funct. Foods.* 31 (2017) 255–265. doi:10.1016/j.jff.2017.02.007.
- [60] M. Iranshahi, R. Rezaee, H. Parhiz, A. Roohbakhsh, F. Soltani, Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin, *Life Sci.* 137 (2015) 125–132. doi:10.1016/j.lfs.2015.07.014.
- [61] V.P. Veerapur, K.R. Prabhakar, M.R. Kandadi, K.K. Srinivasan, M.K. Unnikrishnan, Antidiabetic effect of *Dodonaea viscosa* aerial parts in high fat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: A mechanistic approach, *Pharm. Biol.* 48 (2010) 1137–1148. doi:10.3109/13880200903527736.

- [62] P. Velayutham, A. Babu, D. Liu, E.R. Gilbert, Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids, *J Nutr Biochem.* 24 (2013). doi:10.1016/j.jnutbio.2013.06.003.
- [63] R. MEMİŞOĞULLARI AİBÜ Düzce Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi The Role of Free Radicals and the Effect of Antioxidants in Diabetes, 2005. <http://www.tipdergi.duzce.edu.tr/Dokumanlar/cb5e3aba-f37a-445d-addd-79800c90c141.pdf> (accessed August 17, 2019).
- [64] A. Ghorbani, R. Rashidi, R. Sha, *Biomedicine & Pharmacotherapy* Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function : A mechanistic review, 111 (2019) 947–957. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.127.
- [65] B. Farzami, D. Ahmadvand, S. Vardasbi, F.J. Majin, S. Khaghani, Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 89 (2003) 47–53. doi:10.1016/S0378-8741(03)00220-4.
- [66] N. Qin, X. Hu, S. Li, J. Wang, Z. Li, D. Li, F. Xu, M. Gao, H. Hua, Hypoglycemic effect of silychristin A from *Silybum marianum* fruit via protecting pancreatic islet β cells from oxidative damage and inhibiting α -glucosidase activity in vitro and in rats with type 1 diabetes, *J. Funct. Foods.* 38 (2017) 168–179. doi:10.1016/J.JFF.2017.09.013.
- [67] H.D. Yuan, B. Huang, S.H. Chung, Protective Effect of Cinnamaldehyde on Streptozotocin-induced Damage in Rat Pancreatic β -Cells, *Food Sci. Biotechnol.* 20 (2011) 1271–1276. doi:10.1007/s10068-011-0175-6.
- [68] A. Fattahi, F. Niyazi, B. Shahbazi, M.H. Farzaei, G. Bahrami, Antidiabetic Mechanisms of *Rosa canina* Fruits: An In Vitro Evaluation., *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* 22 (2017) 127–133. doi:10.1177/2156587216655263.
- [69] N. Wang, W. Jing Yi, L. Tan, J. Hui Zhang, J. Xu, Y. Chen, M. Qin, S. Yu, J. Guan, R. Zhang, Apigenin attenuates streptozotocin-induced pancreatic β cell damage by its protective effects on cellular antioxidant defense, (n.d.). doi:10.1007/s11626-017-0135-4.

- [70] S.-H. Lee, S.-M. Kang, S.-C. Ko, M.-C. Kang, Y.-J. Jeon, Octaphloretol A, a novel phenolic compound isolated from *Ishige foliacea*, protects against streptozotocin-induced pancreatic β cell damage by reducing oxidative stress and apoptosis, *Food Chem. Toxicol.* 59 (2013) 643–649. doi:10.1016/J.FCT.2013.07.011.
- [71] M.H. Jang, X.L. Piao, J.M. Kim, S.W. Kwon, J.H. Park, Inhibition of cholinesterase and amyloid- β aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*, *Phyther. Res.* 22 (2008) 544–549. doi:10.1002/ptr.
- [72] H. Lee, S.W. Im, C.H. Jung, Y.J. Jang, T.Y. Ha, J. Ahn, Tyrosol, an olive oil polyphenol, inhibits ER stress-induced apoptosis in pancreatic β -cell through JNK signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469 (2016) 748–752. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.036.
- [73] R. Vinayagam, B. Xu, 7, 8-Dihydroxycoumarin (daphnetin) protects INS-1 pancreatic β -cells against streptozotocin-induced apoptosis, *Phytomedicine.* 24 (2017) 119–126. doi:10.1016/j.phymed.2016.11.023.
- [74] E.A. El-Kordy, A.M. Alshahrani, Effect of genistein, a natural soy isoflavone, on pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats: Histological and immunohistochemical study, *J. Microsc. Ultrastruct.* 3 (2015) 108–119. doi:10.1016/j.jmau.2015.03.005.
- [75] P. Vanitha, S. Senthilkumar, S. Dornadula, S. Anandhakumar, P. Rajaguru, K.M. Ramkumar, Morin activates the Nrf2-ARE pathway and reduces oxidative stress-induced DNA damage in pancreatic beta cells, *Eur. J. Pharmacol.* 801 (2017) 9–18. doi:10.1016/j.ejphar.2017.02.026.
- [76] Y. Zhang, H. Mei, W. Shan, L. Shi, X. Chang, Y. Zhu, F. Chen, X. Han, Lentinan protects pancreatic β cells from STZ-induced damage, (n.d.). doi:10.1111/jcmm.12865.
- [77] D.E.N. ZI, Apoptoz : Programlı Hücre Ölümü, (2003) 499–508.
- [78] G.Ç. DİNÇEL, O. KUL, Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri, Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg. 5 (2016) 86–108. <http://dergipark.gov.tr/gumussagbil/issue/23825/253820>.
- [79] Ö. Sultan Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles,

- Advantages, and Disadvantages Provisional chapter In *Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, (2016). doi:10.5772/intechopen.71923.
- [80] M. Feoktistova, P. Geserick, M. Leverkus, Crystal violet assay for determining viability of cultured cells, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016 (2016) 343–346. doi:10.1101/pdb.prot087379.
- [81] W. Strober, Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, in: *Curr. Protoc. Immunol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2001: p. Appendix 3B. doi:10.1002/0471142735.ima03bs21.
- [82] C.A. Wallen², R. Higashikubo, L.A. Dethlefsen, C.A. Wallen, Comparison of Two Flow Cytometric Assays for Cellular RNA-Acridine Orange and Propidium Iodide', 1980. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cyto.990030303> (accessed August 17, 2019).
- [83] INSULIN (mouse , rat), (n.d.).
- [84] A. Neumeyer-Sickinger, Cellular DCF-DA assay, *Stand. Oper. Proced.* (2015) 1–6. doi:10.1108/BFJ-10-2015-0372.
- [85] A.C. Maritim, R.A. Sanders, J.B. Watkins Iii, Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review, *J Biochem Mol. Toxicol.* 17 (2003) 24–38. doi:10.1002/jbt.10058.
- [86] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 1–85. doi:10.1016/0076-6879(90)86093-B.
- [87] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421. doi:10.1016/0076-6879(90)86134-H.
- [88] Weblet Importer, (n.d.). http://www.doubling-time.com/compute_more.php (accessed September 10, 2019).
- [89] L. Peng, B. Wang, P. Ren, Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 45 (2005) 108–111. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.07.014.

- [90] I. Elbini Dhouib, M. Jallouli, A. Annabi, N. Gharbi, S. Elfazaa, M.M. Lasram, A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches, *Life Sci.* 151 (2016) 359–363. doi:10.1016/j.lfs.2016.03.003.
- [91] F. Shahidi, V. Vamadevan, W.Y. Oh, H. Peng, Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects *Food Bioactives International Society for Nutraceuticals and Functional Foods Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects*, *J. Food Bioact.* 5 (2019) 57–119. doi:10.31665/JFB.
- [92] Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research, (n.d.).
- [93] M.I. Kazeem, T.C. Davies, Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents, *J. Funct. Foods.* 20 (2016) 122–138. doi:10.1016/j.jff.2015.10.013.
- [94] M.A. Rashid, S. Lee, E. Tak, J. Lee, T.G. Choi, J.W. Lee, J.B. Kim, J.H. Youn, I. Kang, J. Ha, S.S. Kim, Carbonyl reductase 1 protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1522–1533. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.015.
- [95] M. Feoktistova, P. Geserick, M. Leverkus, Crystal violet assay for determining viability of cultured cells, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016 (2016) 343–346. doi:10.1101/pdb.prot087379.
- [96] M.Á. Martín, E. Fernández-Millán, S. Ramos, L. Bravo, L. Goya, Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress, *Mol. Nutr. Food Res.* 58 (2014) 447–456. doi:10.1002/mnfr.201300291.