



***Teucrium alyssifolium*'dan İzole Edilmiş Olan Alisin A,
Alisin B (Diterpen), Sirsiliol ve Sirsilineol (Flavonoid)
Bileşiklerinin *In Vitro* Anti-Diyabetik Etkilerinin
Araştırılması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 114Z640

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Araştırmacı:

Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU

Bursiyer:

Buket AYAR

Anıl YILMAZ

EKİM 2015

DENİZLİ

ÖNSÖZ

Dünya çapında yaygın olarak görülen *diabetes mellitus* metabolik bozukluk sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalık tedavisinde insülin, sülfonilüreler ve biguanidler gibi ajanlar kullanılmaktadır. Bunlarla birlikte hastalığın tam bir tedavisi için daha etkili bir anti-diyabetik maddenin geliştirilmesi için arayışlar durmaksızın devam etmektedir. Bu amaçla, laboratuvarımızda daha önceden gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları doğrultusunda *Teucrium alyssifolium* bitkisinden elde edilen saf bileşiklerin olası anti-diyabetik etkileri *in vitro* ortamda araştırılmıştır.

Çalışma süresince *in vitro* modellerde NOEL ve LOEL belirleme çalışmaları yapılmış ve elde edilen veriler kullanılarak anti-diyabetik etki tespiti için glikoz Emilimi, depolanması ve taşınımı, insülin salınımı ve insülin sinyal yolağı ile ilgili analiz ve deneyler yapılmıştır.

Proje yürütücüsü olarak emeğı geçen araştırmacı ve bursiyelere, araştırmacı veya bursiyer olmadıkları halde bir şekilde katkı sağlayan ekip arkadaşlarımızdan Gurbet Ç. TURGUT, Özden ÖZGÜN ve Işıl GAZİOĞLU'na, proje önerimizi değerlendiren ve raporlarımızı okuyan raportör hocalarımıza, TÜBİTAK' ta projemizin değerlendirme sürecine katılan TBAG çalışanlarına çok teşekkür ederim

Tüm bu çalışma 114Z640 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ ve YÖNTEM	10
2.1. Gereçler.....	10
2.1.1. Sarf Malzemeleri	10
2.1.2. Cihazlar	10
2.2. Yöntemler	11
2.2.1. Hücre Hatlarının İdamesi.....	11
2.2.2. BTC6 Hücre Hattı	11
2.2.3. C2C12 Hücre Hattı.....	11
2.2.4. 3T3L1 Hücre Hattı	11
2.2.5. Chang karaciğer (HeLa) Hücre Hattı	11
2.2.6. Caco-2 Hücre Hattı	11
2.3. Test Bileşikleri – Alisin A, Alisin B, Sirsiliol ve Sirsilinol	12
2.3.1. İzolasyonu ve saflaştırılması	12
2.3.2. Model Mekanizma Deneylerinde Kullanılmak İçin Hazırlanışları	12
2.4. Sitotoksosite Testleri	12
2.4.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Ölçümü	13
2.5. Glikoz Kullanım Testi	13
2.5.1. Gliserol-3-Fosfat Dehidrogenaz Aktivite Ölçüm Testi	15
2.6. Glikoz Depolama Testi	16
2.7. Glikoz Taşınımı (Transport) Testi.....	18
2.8. Glikoz Emilimi Testi.....	19
2.9. İnsülin Salınım Testi.....	19
2.10. İnsülin Sinyal Yolağı Analizleri	21
2.10.1. RNA İzolasyonu	21
2.10.2. cDNA Sentezi.....	22
2.10.3. Gerçek Zamanlı Nicel PZR (qRT-PCR)	22
2.11. Test Bileşiklerin Kanser İlişkili Genlerin İfade Düzeylerine Etkilerinin Saptanması 25	
2.12. İstatiksel analizler	27
3. BULGULAR.....	28
3.1. Sitotoksosite Testi	28
3.1.1. Laktat Dehidrogenaz Aktivite Tayini	33

3.2. Glikoz kullanımı Testi.....	36
3.2.1. Gliserol-3-Fosfat Dehidrogenaz Aktivite Tayini.....	37
3.3. Glikoz Depolama Testi.....	39
3.4. Glikoz Taşınımı Testi.....	40
3.5. Glikoz Emilimi Testi.....	42
3.6. İnsülin Salınımı Testi.....	42
3.7. İnsülin Sinyal Yolağı Gen İfade Analizleri.....	44
3.7.1. Test Bileşiklerin BTC6 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi.....	45
3.7.2. Test Bileşiklerin C2C12 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi.....	46
3.7.3. Test Bileşiklerin 3T3-L1 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi.....	48
3.7.4. Test Bileşiklerin Chang karaciğer Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi.....	51
3.7.5. Test Bileşiklerin Caco-2 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi.....	55
3.8. Test Bileşiklerin Kansere İlişkili Bazı Genlerin İfade Düzeylerine Etkisi.....	58
4. TARTIŞMA – SONUÇ.....	61
5. SONUÇ.....	71
6. KAYNAKLAR.....	72

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. BioVision LDH tayin kiti bileşenleri.....	13
Tablo 2. BioVision glikoz tayin kiti bileşenleri.....	14
Tablo 3. BioVision glikoz tayin kiti bileşenleri.....	15
Tablo 4. BioVision glikojen tayin kit bileşenleri.....	17
Tablo 5. Millipore insülin ELISA kit bileşenleri.....	20
Tablo 6. QIAGEN RNeasy Plus mini kit bileşenleri	21
Tablo 7. Analiz edilen diyabet ilişkili genlerin primer dizileri ve bilgileri.	23
Tablo 8. Çalışılan kanser ilişkili genler için kullanılan primer dizileri ve bilgileri.	25
Tablo 9. Tüm hücre hatlarında test bileşiklerinin LDH aktiviteleri üzerine etkileri	35
Tablo 10. C2C12, Chang karaciğer ve 3T3-L1 adiposit hücrelerinin test ve pozitif bileşiklerle iki saatlik inkübasyon sonucunda bulunduğu ortamlardaki glikoz konsantrasyonları	37
Tablo 11. Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesine ait değerler	38
Tablo 12. C2C12 ve Chang karaciğer hücre hatlarında pozitif kontrol ve test bileşiklerinin etkisiyle depolanan glikojen miktarları	40
Tablo 13. Pozitif kontrol ve test bileşiklerin “transwell” içerisindeki oluşturulan Caco-2 hücre hattı katmanı üzerinden glikoz taşınımına olan etkilerinin zamansal değerleri	41
Tablo 14. Caco-2 hücrelerinin farklı test bileşikleri ile birlikte bulunduğu bulunduğu ortamların apikal yüzeyinde alfa-glikosidaz tarafından salınan glikoz konsantrasyonları.	42
Tablo 15. Düşük konsantrasyonlarda (NOEL) Alisin A (AA), Alisin B (AB), Sirsiliol (SL) ve Sirsilinol (SN) bileşiklerinin değişik hücre hattında insülin yolağı ve glikoz homeostazında yer alan çeşitli genlerin ifade düzeylerine etkileri.	66
Tablo 16. Yüksek konsantrasyonlarda (LOEL) Alisin A (AA), Alisin B (AB), Sirsiliol (SL) ve Sirsilinol (SN) bileşiklerinin değişik hücre hattında insülin yolağı ve glikoz homeostazında yer alan çeşitli genlerin ifade düzeylerine etkileri.	67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İnsülinin genel etki mekanizması (Nandi vd. 2004'ten revize edilmiştir)	2
Şekil 2. İnsülinin detaylı sinyal iletim mekanizmaları.....	3
Şekil 3. <i>T. alyssifoliumdan</i> izole edilmiş olan diterpen ve flavonoid bileşiklerin molekül yapıları	8
Şekil 4. BTC6 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.....	28
Şekil 5. BTC6 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilinol'ün hücre canlılığına etkisi.....	29
Şekil 6. C2C12 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.....	29
Şekil 7. C2C12 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilinol'ün hücre canlılığına etkisi.....	30
Şekil 8. 3T3 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.....	30
Şekil 9. 3T3 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilinol'ün hücre canlılığına etkisi.....	31
Şekil 10. Chang karaciğer hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.....	31
Şekil 11. Chang karaciğer hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilinol'ün hücre canlılığına etkisi.....	32
Şekil 12. Caco-2 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.	32
Şekil 13. Caco-2 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilinol'ün hücre canlılığına etkisi.....	33
Şekil 14. A) Örnek laktat dehidrogenaz aktivite ölçüm test sonuçları görüntüsü	34
Şekil 15. Ölçülen veriler doğrultusunda oluşturulan standart NADH eğrisi	35
Şekil 16. C2C12 ve Chang liver hücre hatlarıyla yapılan glikoz kullanım testi.....	36
Şekil 17. Dönüştürülmüş 3T3L1 hücre ile yapılan temsili gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivite test plakası resmi.....	37
Şekil 18. Elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan NADH standart eğrisi.....	38
Şekil 19. Temsili glikojen ölçüm plaka görüntüsü.....	39
Şekil 20. Oluşturulan standart glikojen eğrisi	40
Şekil 21. Oluşturulan standart glikoz eğrisi.	41
Şekil 22. BTC6 hücre hattında Millipore İnsülin ELISA kiti ile elde edilen örnek plaka görüntüsü	43
Şekil 23. Oluşturulan standart glikoz eğrisi.	43

Şekil 24. Örnek olarak Chang karaciğer hücre hattında IRS geninin optimizasyon çalışmaları	44
Şekil 25. Örnek standard kalibrasyon eğrisi.....	44
Şekil 26. Alisin A ve B test bileşiklerinin pankreatik B hücre hattında (BTC6) diyabet ilişkili IRS1 ve GLUT2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri	45
Şekil 27. Sirsiliol ve Sirsilineol test bileşiklerinin pankreatik B hücre hattında (BTC6) diyabet ilişkili IRS1 ve GLUT2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri	46
Şekil 28. Alisin A test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	46
Şekil 29. Alisin B test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	47
Şekil 30. Sirsiliol test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	48
Şekil 31. Sirsilineol test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	48
Şekil 32. Alisin A test bileşiğinin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar	49
Şekil 33. Alisin B test bileşiğinin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	50
Şekil 34. Sirsiliol test bileşiğinin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	50
Şekil 35. Sirsilineol test bileşiğinin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	51

Şekil 36. Alisin A test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	52
Şekil 37. Alisin B test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	53
Şekil 38. Sirsiliol test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	54
Şekil 39. Sirsilineol test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	55
Şekil 40. Alisin A test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	56
Şekil 41. Alisin B test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	57
Şekil 42. Sirsiliol test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	57
Şekil 43. Sirsilineol test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	58
Şekil 44. Alisin A test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	59
Şekil 45. Alisin A test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri.....	60

ÖZET

Diabetes mellitus yaygın metabolik bozukluklardan biridir ve dünyada toplam nüfusun % 1,5'u bu hastalıktan muzdariptir. İnsülin yanı sıra sülfonilüreler ve biguanidler gibi oral hipoglisemik ajanlar hala hastalığın tedavisinde kullanılan en önemli ajanlar olmasına rağmen, hastalığın tam bir tedavisi için daha etkili bir anti-diyabetik maddenin geliştirilmesi için arayışlar durmaksızın devam etmektedir.

Laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz pilot çalışmalar *Teucrium alyssifolium* ekstresinin anti-diyabetik etkisini kuvvetle destekleyen kanıtlar nitelikteydi. Bu verilerden yola çıkarak, proje kapsamında *Teucrium alyssifolium* ekstresinden izole edilerek saflaştırılmış Alisin A, Alisin B, Sirsiliol ve Sirsilinol bileşiklerinin olası anti-diyabetik özellikleri *in vitro* hücre kültürü modellerinde araştırılması gerçekleştirildi.

Proje kapsamında çalışılan bileşiklerden Sirsiliol ve Sirsilinol glikoz homeostazında rol oynayan hiçbir model mekanizma üzerinde anti-diyabetik etki göstermemiştir.

Bunun aksine, Alisin A ve Alisin B bileşikleri sitotoksik olmayan düşük dozlarda aşağıdaki etkileri saptandı

1. T3-L1 adiposit, C2C12 ve Chang karaciğer hücrelerinde glikoz alımını en az insülin etki düzeyinde olacak şekilde artırdı
2. C2C12 ve Chang karaciğer hücrelerinde glikojen içeriğini insülin ve metforminden daha fazla olacak şekilde artırdı
3. Caco-2 hücrelerinde AG (alfa-glikosidaz) ve GLUT2 ekspresyon düzeylerini baskıladı
4. Caco-2 hücrelerinde SGLT1 ve GLUT1-5 ekspresyon düzeylerini baskıladı
5. BTC6 pankreatik hücrelerinde IRS-1 ve GLUT2 ekspresyon düzeylerini indükledi
6. 3T3-L1 ve C2C12 hücrelerinde INSR, IRS- 2, PI3K, GLUT4, AKR, PK, G6P ekspresyon düzeylerini indükledi,
7. Caco-2 hücreleri üzerinden glikoz transportunu artırdı
8. BTC6 pankreatik hücrelerinde insülin salınımını etkilemedi

Bu veriler Alisin A ve Alisin B'nin glikoz homeostazında önemli rol oynayan model mekanizmalardan özellikle glikoz alım, kullanım ve depolanması mekanizmaları üzerinde anti-diyabetik şekilde çok önemli etki gösterdikleri tespit edildi. Ayrıca, bu iki bileşiğin glikoz metabolizmasında ve insülin sinyal yolağında rol oynayan anahtar genlerin ifade düzeylerinde de sonuç anti-diyabetik olacak şekilde değişiklikler yaptığı da saptandı. Alisin A ve B incelenen glikoz homeostazında önemli olan mekanizmaların hemen hepsinde pozitif veriler ortaya

koyarak doğal ve pleotropik anti-diyabetik ajan oldukları yönünde önemli veriler üretildi. Bunu yanı sıra her iki bileşimin düşük dozlarda bu etkileri gerçekleştirmeleri ve bu dozlarda kanser gibi bir diğer önemli bir patolojik durum için de koruyucu yan etkilere sahip olması bir diğer artı değer ve dikkat çekici durumdur.

Anahtar Kelimeler:

Anti-diyabetik, *Teucrium alyssifolium*, Alisin A, Alisin B, Flavanoid Sirsiliol, Sirsilineol, İnsülin, BTC6, 3T3-L1, C2Cl2, Caco-2, Chang Karaciğer Hücreleri

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a common metabolic disorder and about 1.5% of the world population is suffering from DM. Although insulin, as well as oral hypoglycemic agents such as sulfonylureas and biguanides, is still the most important agents in treating the DM, studies searching for a more effective anti-diabetic agents are being carried out continuously.

In our laboratory, we have found out in a pioneering pilot study strongly supporting the antidiabetic effects of extract of *Teucrium alysifolium*. Based on these data, it is aiming to investigate the potential anti- diabetic effects of Alysine A, Alysine B, Cirsiliol, and Cirsilineol purified from *Teucrium alysifolium* using in vitro cell culture models.

Of the studied compounds, Cirsiliol and Cirsilineol did not show any anti-diabetic effect on the any of the model mechanism involved in glucose homeostasis.

On the other hand, Alysine A and Alysine B exerted the following effects at low doses as much as none cytotoxic doses:

1. Increased glucose uptake at least at the level of insulin action in T3-L1 adipocytes, C2C12 and Chang liver cell
2. Increased the glycogen content in C2C12 and Chang liver cell much more than the insulin and metformin levels
3. Suppressed the AG and the GLUT2 expression levels in Caco-2 cells
4. Suppressed the SGLT1 and GLUT1-5 expression levels in Caco-2 cells
5. Induced the expression levels of IRS-1 and GLUT2 in BTC6 pancreatic cells
6. induced the expression levels of INSR, IRS- 2, PI3K, GLUT4, AKR, PK, G6P in 3T3-L1 and C2C12 cells
7. Increased the glucose transport through Caco-2 cell layer
8. Did not affect insulin secretion in pancreatic BTC6 cells

As a result, these data strongly support the anti-diabetic action of Alysine A and Alisin B on particularly important model mechanism that play role in glucose homeostasis such as glucose uptake, use, and storage. Furthermore, these two compounds were found to affect the expression level of the key genes in glucose metabolism and insulin signaling pathway so that the results would be anti-diabetic. Alisine A and B have shown important and positive results on the mechanisms in glucose homeostasis that they are natural and pleiotropic anti-diabetic agents. In addition to these anti-diabetic action, it is striking that both compounds at these low

doses have protective side effects on another important pathological condition known as cancer.

Keywords:

Diabetes, Anti-diabetic, *Teucrium alyssifolium*, Diterpene (Alysine A, Alysine B), Flavanoid (Cirsiliol, Cirsilineol), Insulin, BTC6, 3T3-L1, C2C12, Caco-2, Chang Liver cells

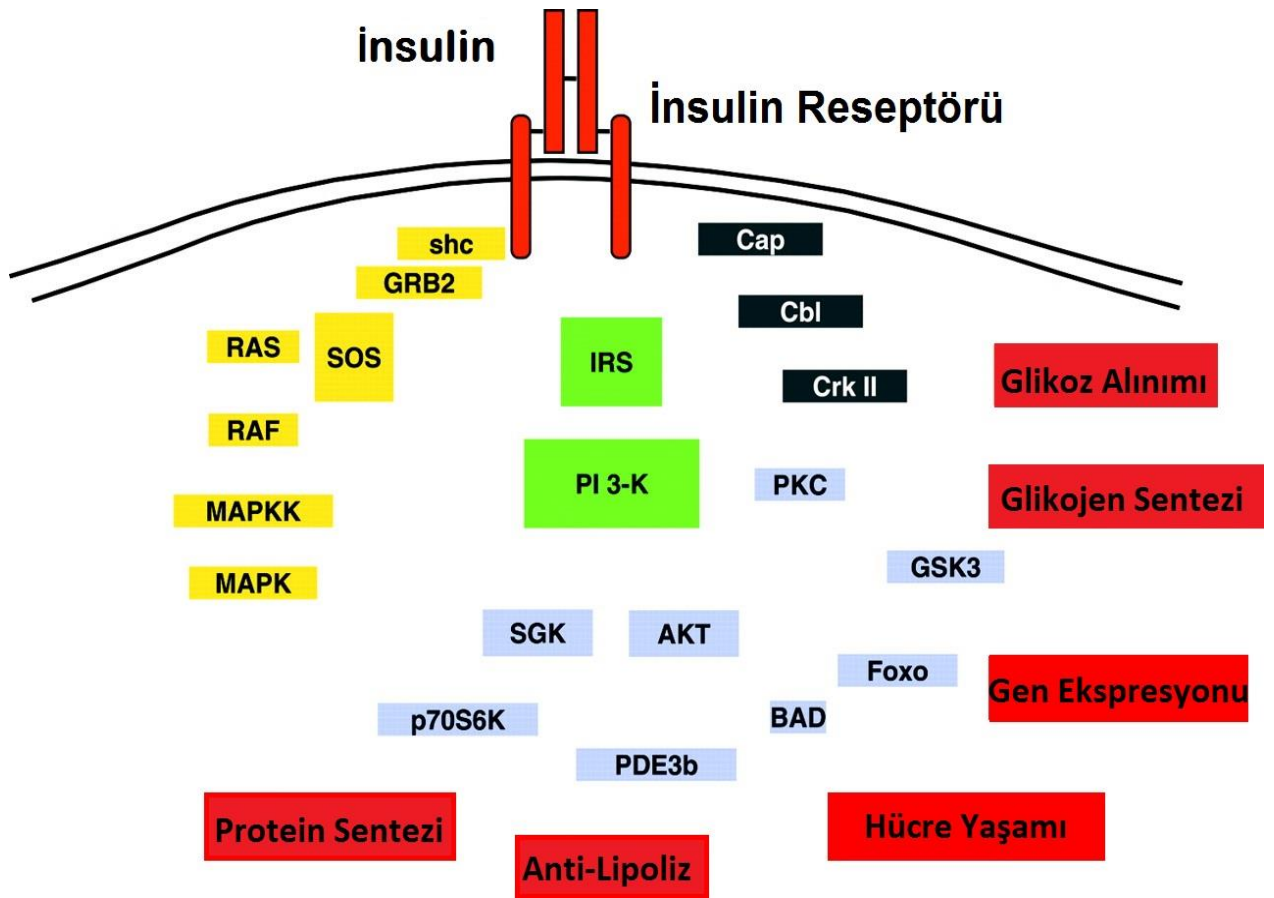
1. GİRİŞ

Diyabet, kan şekerini düzenleyen insülin hormonunun yeterli üretilmediği zaman ya da vücudun insülini etkin kullanamadığı zaman yüksek kan şekeri düzeyi olarak ortaya çıkan kronik bir hastalıktır. Diyabetin kontrol edilmediği durumlarda oluşan hiperglisemi veya yüksek kan şekeri, zamanla, özellikle sinirler ve kan damarları gibi vücudun birçok sistemlerinde ciddi hasarlara yol açar. Dünya çapında 347 milyon kişinin diyabet olduğu bildirilmektedir (Danie vd., 2011, WHO, 2014). 2004 yılında, yaklaşık 3,4 milyon kişi yüksek kan şekeri sonuçları öldüğü bildirilmektedir (WHO, 2009) ve 2010 yılı için de benzer rakamlar tahmin edilmektedir. Yapılan yansıtım ve kestirim çalışmaları, diyabetin 2030 yılında dünyadaki ölümlerin 7. büyük nedeni olacağını öngörmektedir (Mathers ve Loncar, 2006).

Diyabetin Tip 1 (T1DM insüline bağımlı), Tip 2 (T2DM-insüline bağımlı olmayan) ve gestasyonel (gebelik) olmak üzere 3 majör şekli olmasına rağmen en yaygın biçimi T2DM'dir. İnsüline bağımlı diyabetik hastalar, otoimmün tepki nedeniyle pankreatik beta hücre yıkımı neticesinde çok az insülin üretirler veya hiç insülin üretemezler. T2DM hastalarda, hücreler uygun bir şekilde insüline yanıt vermeme (insülin direnci) nedeniyle glikoz depolama eksikliği ile sonuçlanır. İnsülin direnci, özellikle uzun süreli yüksek kalorili diyet ve diğer risk faktörleri ile birlikte, hayatın ilerleyen yaşlarında gelişebilir. İnsülin direnci adipoz doku, pankreatik adacıklar, karaciğer ve iskelet kası arasındaki karmaşık sinyal mekanizmasının düzen bozukluğuna neden olmaktadır (Saltiel ve Kahn, 2001; Nandi vd., 2004; Liu vd., 2006). Hastalığın spesifik moleküler patolojisi net olmamakla beraber; aile geçmişi, erken dönem gelişiminde değişiklik, aşırı besin alımı, obezite, fiziksel aktivite azlığı ve yaşlanma gibi etkenler hastalık oluşumuna zemin hazırlamaktadır.

Mitokondriyel oksidatif metabolizma ve ATP üretimi, yağ asidi oksidasyonu, proinflamatuvar sinyal oluşumu ve beta hücrelerinin gelişim ve metabolizmasındaki bir değişim insülin salınımı azaltabilir. Bu durum insülin sinyal oluşumunu bozacağından insülin direncine sebep olabilir (Zelezniak vd. 2010). Hem T1DM, hem de T2DM için kontrol edilemeyen kan şekeri düzeyi karşılaşılan komplikasyonların gelişiminde ana etmen olmasından dolayı, kan şekeri düzenlenmesinde en önemli bir hormon olan insülin mekanizmasına (Şekil 1) genel olarak kısaca değinmek gereklidir:

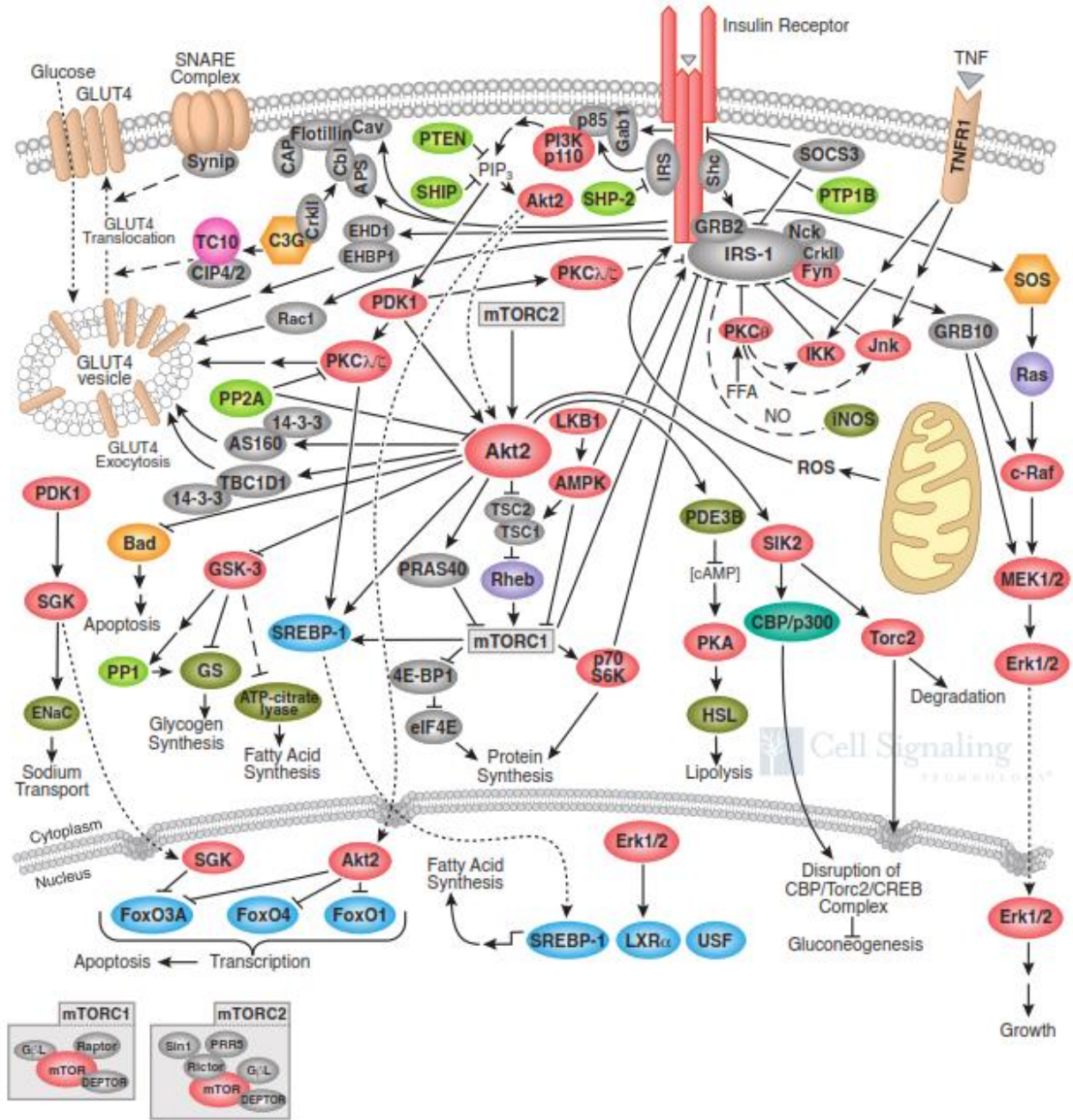
İnsülin, büyüme faktörü reseptör tirozin kinazların bir alt familyasına ait bir hücre yüzey reseptörüne bağlanarak etki eder. Bu alt aile üç üyeden oluşur: insülin reseptör (INSR), tip 1 insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörü (IGF1R) ve INSR ilişkili reseptör (IRR). Reseptörün ekstraselüler domeynine insülinin bağlanmasıyla reseptör otofosforilasyonu ve hücre içi protein substratların (IRS) tirozin fosforilasyonunu ile sonuçlanan bir dizi yapısal değişikliği ortaya çıkarmaktadır (Ullrich vd., 1985; Bornfeldt ve Tabas, 2011; Gallagher ve LeRoith, 2011; Bayley ve Devilee, 2012).



Şekil 1. İnsülinin genel etki mekanizması (Nandi vd. 2004'ten revize edilmiştir)

İnsülin çok çeşitli ve değişik yolağları aktive/inaktive etmektedir (Şekil 2). Bunlar arasında, Akt/PKB (protein kinaz B) ve PKC ζ kaskadlar aracılı fosfatidilinositol 3-kinaz yolağı (PI3K) insülinin işlevinde çok önemli bir rolü vardır (Nakae vd., 2001; Cheng vd., 2010). Aktif Akt, GSK-3 (glikojen sentaz kinaz 3) inhibisyonu ile glikojen sentezini indükler, mTOR ve alt elemanları yoluyla protein sentezini baskılar ve çeşitli pro-apoptotik ajanlar (Bad, Forkhead ailesi transkripsiyon faktörleri, GSK-3) aracılığıyla da hücre yaşamını düzenler. İnsülin kas ve

adipositlerde, plazma zarına GLUT4 veziküllerin translokasyonunu sağlayarak glikoz alımını teşvik eder. GLUT4 translokasyonu da PI3K/Akt yolu aracılığıyla oluşur (Rowland vd., 2011). İnsülinin aynı zamanda çoğunlukla hem Akt kaskadı ve hem de Ras/MAPK yolağının aktivasyonu ile aracılık ettiği büyüme ve mitojenik etkileri vardır (Siddle, 2011). Buna ek olarak, insülin CREB/CBP/Torc2 bağlanmasını ketleyici etkisiyle karaciğerde glukoneogenezi inhibe eder (Fritsche vd., 2008). İlave olarak, insülin sinyali CREBP-1C, USF1 ve LXR aktivasyonu ile yağlı asit sentezini teşvik eder (Wong ve Sul, 2010; Altarejos ve Montminy, 2011).



Şekil 2. İnsülinin detaylı sinyal iletim mekanizmaları (www.cellsignal.com adresinden izinin alınmıştır; erişim 15 Ekim 2015).

Bu veriler ışığında; T2DM ilişkili yüksek kan şekeri, bozulmuş glikoz toleransı ve insülin direnci gibi glikoz metabolizması bozukluklarının tedavisinde klinik kullanımı da olabilecek yeni yapıların gelişimine yol açabilecek, insülinin etkisini taklit eden maddelerin tanımlanmasını kapsayan çalışmalar yıllardır sürdürülmektedir ve hala devam etmektedir (Oshima vd., 1987; Lerner vd., 1997; Pushparaj vd., 2001; Chang vd., 2007; Trapp vd., 2010; Zhou vd., 2012; Kumar vd., 2013; Getek vd., 2014; Ramadhan ve Phuwapraisirisan, 2015).

In vivo anti diyabetik etkinlik çalışmaları için normoglisemik ya da hiperglisemik hayvan modelleri ve zaman zaman da insanlar kullanılmaktadır. *In vivo* deneyler, yeni hipoglisemik ajanların etkinliğini kanıtlamak için mutlaka gerekli ve önemli olmakla birlikte; hayvan testleri, bileşiklerin spesifik etki mekanizmalarını ortaya çıkarmakta nispeten daha az etkilidir çünkü kan glikoz seviyesini düşürülebilir pek çok mekanizma vardır ve bunları hayvan modellerinde kontrol etmek daha zordur. Bunun yanı sıra, T2DM hayvanları temin etme, model oluşturma ve bakımı ile ilgili mali kısıtlamalar ile deney hayvanlarının kullanımındaki sosyal ve etik kısıtlamalar birleştiğinde potansiyel anti-diyabetik ajanların taraması için bir dizi *in vitro* modeller daha pratik bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Bu modeller, ayrıca, deney hayvanlarının gereksiz yere kullanımlarını engelleyerek olası etik sorunların aşılmasında da önemli olmaktadır. *In vitro* modellerde etkinliği kanıtlanan bileşiklerin daha sonra *in vivo* sistemlerde test edilmesi daha doğru bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla, potansiyel anti-diyabetik ajanların etkinliklerini ve mekanizmalarını araştırmak için bir dizi *in vitro* modeller geliştirilmiştir (Patel ve Mishra, 2008; Skelin vd., 2010).

In vitro tarama teknikleri, özel hücre hatlarında bileşiklerin/moleküllerin farmakokinetik etkilerinin çalışılması için olanak sunar (Van de Venter vd., 2008). Kas kökenli C2C12 myosit hücreleri ile fibroblast kökenli 3T3-L1 adiposit hücrelerinin insüline duyarlı olarak GLUT4 translokasyonu artışı ile kültür ortamından glikoz alımı yaptıkları gösterilmiştir (Brunetti vd., 1989; Nedachi ve Kanzaki, 2006). Bu hücre hatları, memelilerde periferik insülin etkili glikoz homeostazında rol oynayan ve glikoz kullanımına katılan temel dokulara benzerlik göstermektedir. 3T3-L1 adipositler, aynı zamanda yaygın olarak 30 yıldan fazla metabolik hastalık araştırmalarında kullanılmaktadır. Bu hücreler, diyabet ve metabolik bozukluklar ile ilişkili temel hücresel mekanizmalarının anlaşılmasında ve ilerleme sağlanmasında çok önemli rol oynamışlardır (ZenBio A.Ş. 2010). Kas hücrelerinin aksine karaciğer hücreleri (Chang vb.) insüline duyarlı olmayan glikoz taşıyıcıları içerirler ve insülin bağımlı glikoz alımı için daha az duyarlıdır. Chang karaciğer hücreleri, insülin reseptörü ifade eden insan normal epitel hücresinden türetilmiştir ve insüline duyarlı olduğu gösterilmiştir (Rengarajan vd., 2007; Parthasarathy vd., 2009). Bir diğer model ise BTC6 (Beta Tümör Hücre) hattıdır. Bu hücreler pankreatik beta hücrelerinde SV40 (bölge sıçan insülin II geni promotörü tarafından kontrol

edilir) eksprese eden transgenik farelerden elde edilmiştir. Gelişen tümörler çıkarılır ve hücre hattı oluşturmak için kültüre edilir. Pankreatik B-hücresi metabolizmasındaki bozukluk ve işlevin giderek kaybolması T2DM ile doğrudan ilişkilidir (Fröde ve Medeiros, 2008). Bu hücreler hem proinsülin I ve hem de proinsülin II sentezler, glikozun fizyolojik konsantrasyonlarına yanıt oluştururlar ve proliferatif özelliklerini korurlar. Caco-2 hücreleri, insan kolon adenokarsinom kökenlidir ancak kültür ortamında 2 hafta sonrasında kendiliğinden enterosit benzeri bir fenotipe farklılaşırlar. Bu hücreler, iyi gelişmiş sıkı bağlar ile kenetlenmiş tek katman hücreler oluşturur ve bağırsak lümeninde transselüler besin ve ilaç taşıma çalışmalar için iyi bir *in vitro* model olarak değerlendirilmiştir (Hidalgo vd., 1989; Artursson, 1990). Caco-2 hücrelerinin glikoz ve besinlerin emilimleri ile ilgili Na⁺/Glikoz ko-transporter (SGLT1) ve kolaylaştırıcı taşıyıcıları (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 ve GLUT5) eksprese ettiği gösterilmiştir (Harris vd., 1992; Mahraoui vd., 1994). Bu hücre hattı, glikoz transportu ve glikoz transporter ekspresyonunun düzenlenmesi için benzersiz insan *in vitro* modeli oluşturmaktadır (Monsenero vd., 1995; Binsonnette vd., 1996).

Potansiyel ajanların hipoglisemik etkinliği yukarıda tanımlanan *in vitro* sistemlerde genellikle üç ana başlık altında araştırılmaktadır: insülin salınımı, glikoz alımı ve insülin yolağındaki enzimler üzerine etkileri. Hiper- ya da hipo-glisemik koşullarda insülin salgılanması ve glikozun hücrelere alımı, glikoz metabolizmasını incelemek için araştırılan önemli bir biyolojik süreçlerdir. Glikoz alımı dokulara bağlı olarak farklılık gösterir. Glikoz alınımı ya kolaylaştırılmış difüzyon yolu (GLUT- Glikoz taşıyıcılar) ile ya da ikincil aktif taşıma (SGLT- aktif taşıyıcıları) ile gerçekleştirilir (Medina ve Owen, 2002; Leney ve Tavaré, 2009; Bogan, 2012). İnsanlarda 14 GLUT proteini ifade edilmektedir ve glikoz da dâhil olmak üzere fruktoz, miyoinositol ve ürat gibi başka molekülleri de taşımaktadırlar. GLUT ifadesi hücre tipine özeldir ve hormonal ve çevresel faktörlerle kontrol edilir (Medina ve Owen, 2002). Diyabet çalışmalarında en yaygın GLUT1-5 araştırılmaktadır (Thorens ve Mueckler, 2010; Ernest vd., 2011). GLUT1 her yerde bulunan birçok memeli dokusunda ifade edilen yüksek afiniteli bir glikoz taşıyıcısıdır. Kan-beyin bariyeri, eritrosit ve nöronal hücre zarı boyunca glikoz taşınmasını sağlar. GLUT2 yetişkin karaciğer, böbrek, bağırsak epiteli ve pankreas beta-hücrelerinde düşük afiniteli glikoz taşıyıcısıdır (Gorovits ve Charron, 2003). Karaciğerde olduğu gibi, heksokinaz glikozun glikolitik yolağa girişini düzenler ve GLUT2 ile birlikte, B-hücrelerinde glikoz alınımında çok önemli bir rol oynar (Medina ve Owen, 2002). GLUT3 beyin nöronal hücrelerde bulunur ve bu hücrelere sürekli glikoz alınımını sağlar. Bu taşıyıcı glikozun insülin aracılı alınımında ve enerji sağlayan bir bileşik haline dönüştürülmesinde rol oynar (Katzung, 1995; Lienhard vd., 1992). Kalp, iskelet kası ve yağ dokusu gibi özellikle insüline duyarlı olan dokularda ifade edilen GLUT4 yüksek afiniteli bir glikoz taşıyıcısıdır. GLUT4 şimdiki kadar karakterize edilmiş olan tek insülin duyarlı taşıyıcı olması nedeniyle benzersizdir. Fruktoz emiliminde rol oynayan

GLUT5 ince bağırsak ve böbrekte ifade edilir (Katzung, 1995;. Lienhard ve arkadaşları, 1992). Şekerler, anyonlar, vitaminler ve kısa zincirli yağ asitleri için ko-taşıyıcılar olan insan SGLT (SLC5) gen ailesinin 12 üyesi vardır. Sodyum-bağımlı glikoz taşıyıcıları ince bağırsak mukozasında (enterositler SGLT1) ve nefron proksimal tübülde (SGLT2) bulunan glikoz taşıyıcı ailesidir.

İnsülin reseptörü, insülin etkisinin membran üzerinden iletilmesinde çok önemli rol oynayan bir membran glikoproteindir. Bu nedenle, çeşitli diyabetik sendromlarda bu proteinin işlevsel ve ekspresyonel araştırılması anlamlı bir yaklaşımdır (Sechi vd., 1992; George vd., 2012). İnsülin reseptörü, alfa alt-biriminin COOH-terminalinde 12 amino asitten oluşan bir dizinin (Ex11) alternatif splicing neticesinde varlığı yada yokluğuna göre farklı iki izoform halinde bulunmaktadır. Bu iki izoformun T2DM durumunda ekspresyon düzeylerinde farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Sesti vd., 2001). İnsülin reseptör substrat-1 (IRS1) insülin sinyal yollarında önemli bir unsurdur ve IRS1 genindeki mutasyonların tip 2 diyabet ile ilişkili özelliklerin belirlenmesinde bir rol oynadığı bildirilmiştir (Laakso vd. ,1994; Almind vd., 1996; Caruso vd., 2014). IRS proteinleri katalitik etkinliğe sahip olmayan, ancak birden fazla etkileşim domeynleri ve fosforilasyon motiflerinden oluşur. İnsanda en az dört IRS proteini ifade edilir. IRS-1 ve IRS-2 yaygın olarak ifade edilen izoformlardır (Morris 2001). İnsüline dirençli bireylerde insülin etkisinin hedef dokularında IRS ifade ve işlev kusurları bildirilmiştir. Obez bireylerden elde edilmiş iskelet kas örneklerinde IRS-1 içeriğinde önemli bir azalma gözlenmiştir (Goodyear vd., 1995; Sesti vd., 2001). IRS proteinleri insülin reseptörünü PI3K ve ekstraselüler sinyal aktive edilmiş kinaz (ERK) kaskadlarına bağlayan önemli iskele proteinleridir. PI3K 110 kDa bir katalitik alt birim ile 85 yada 55 kDa 'lık bir düzenleyici alt birimden oluşan heterodimerdir (Schultze vd., 2012). IRS'ın periferik insülin yanıtı yanı sıra pankreatik β -hücrelerinin proliferasyonu ve işlevi için de önemli bir rolü vardır. Farelerde IRS sinyalizasyon düzensizliğinin periferik insülin direnci sırasında telafi edilemeyen hiperinsülinemiye neden olduğu gösterilmiştir (Yong ve White, 2004). IRS protein sinyal yolağı, akut yaralanma ve enfeksiyon ile veya yaşlanma ve obezite ile bağlantılı kronik stres sonucu insülin direnci oluşumunda önemli bir mekanizma olan serin fosforilasyonu yada, proteazom aracılı yıkım ile baskılanmakta ve düzenlenmektedir. Bu nedenle diyabetik çalışmalarda IRS protein işlev ve ifadeleri, baskılanmaları ve proteozomal yıkımları da sıklıkla araştırılmaktadır (Aguirre vd., 2000).

Genel olarak, belirli bir metabolik yolun fonksiyonel aktivitesi bu yolu düzenleyen enzimlerin seviyeleri tarafından yansıtılır. Bu nedenle glikoliz, glukoneogenez ve pentoz fosfat yolağında yer alan ve glikoz homeostazında önemli rol oynayan düzenleyici enzimlerin (heksokinaz, piruvat kinaz, PEP karboksikinaz, glikoz 6-fosfataz, fosfofruktokinaz, fruktoz1,6-bifosfataz,

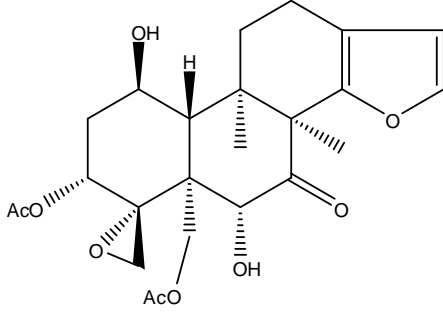
gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz, glikoz 6-fosfat dehidrojenaz vb.) ekspresyon ve aktivite düzeyleri de genel olarak diyabet çalışmalarında incelenen parametreler arasında yer almaktadır (Nehal ve Baquer, 1989; Nandan ve Beale, 1992; Clore vd., 2000; Jeong vd., 2012; Unakal ve Newman, 2014). α -Glikozidaz (α -D-glukosid glukohidrolaz) substratın indirgeyici olmayan ucundan α -glikoz salınımını katalizleyen ekzo tip bir karbohidrolazdır (Kimura vd., 2004). İnce bağırsak epitelinde bir membran enzimidir ve oligosakkaritlerin absorbe edilebilir monosakaridler haline hidrolitik parçalanmasını katalize ederek ince bağırsakta glikoz emilimini sağlar. Bu nedenle α -glikozidaz inhibitörleri karbohidrat alınımı sonrasında kan şekerinin yükselmesini yavaşlatır (Kumar vd., 2011).

Aldoz redüktaz (AKR, E.C 1.1.1.21) hiperglisemi patogeneğinde önemli rol oynayan glikasyon ürünlerinin (AGE) sentezinde yer alan poliol yolakta ilk hız sınırlayıcı basamağı katalizleyen enzimdir (Brownlee vd., 2005). AKR diyabet komplikasyonlarından etkilenen gözler, böbrekler ve diğer dokularda ifade edilmektedir. Artmış glikoz poliol yolağına girer ve AKR tarafından sorbitole indirgenir (Huebschmann vd., 2006). Çeşitli AKR inhibitörlerinin bazı hayvan modellerinde ya da hastalarda diyabetik nefropati önlemede önemli olduğu ortaya konmuştur. Benzer olarak, doğal ürünlerden elde edilen AKR inhibitörlerinin hayvan modellerinde diyabetik komplikasyonların gelişmesini geciktirdiği tespit edilmiştir (Obrosova vd., 2003; Kim vd., 2008; Sung vd., 2010).

Diyabet tedavisi için şifalı bitkilerin kullanımı M.Ö. 1550'ye ait Ebers papirüsa kadar uzanmaktadır (Bailey ve Day, 1989). İnsülin ve diğer modern oral hipoglisemik ajanların keşfedilmesine ve kullanılmasına rağmen diyabet tedavisi için bitkisel kökenli daha güvenli ve daha etkili ilaçlar için arayışlar hala devam etmektedir (Bailey ve Day, 1989; Lin, 1992). Birçok bitkisel kullanım insülinin yüksek maliyeti ve tıbbi yardım eksikliği nedeniyle özellikle fakir toplumlarda geleneksel tedaviye alternatif olarak kalmıştır. Teucrium cinsi ve özellikle *T. polium* türü diyabet için yıllardır bir yan etki bildirilmeksizin, etki modu hakkında herhangi detaylı ve kesin bir bilgi olmadan hipoglisemik yardımcı olarak kullanılmaktadır (Gharaibeh vd., 1988; Esmaili ve Yazdanparast, 2004; Lv vd., 2014). Bizde bilinen bu türün ülkemize endemik olan *Teucrium alyssifolium* Stapf türünden elde ettiğimiz ekstre ile laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz tarama çalışmasında anti-diyabetik etki olasılığını tespit ettik. Bu veriler *T. alyssifolium* bitkisinin anti-diyabetik etki potansiyelinin olduğunu düşündürmektedir ve destekler niteliktedir. *T. alyssifolium* anahtar kelimesi ile literatür taraması yaptığımız zaman, ülkemiz bilim insanları tarafından bu bitkilen izole edilmiş diterpen ve flavavoid bileşikler olduğunu bulduk. *T. alyssifoliumdan* izole edilmiş olan diterpen ve flavonoid bileşiklerin moleküler özellikle aşağıda verilmektedir (Topcu vd., 1995; 1996; 1997):

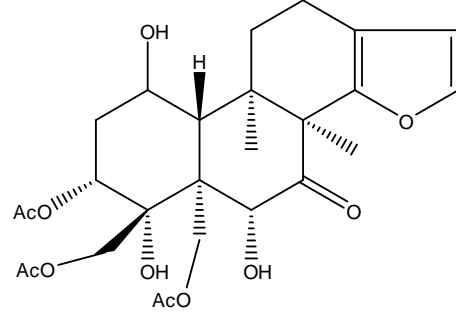
Alisin A (C₂₄H₃₀O₉)

Molekül ağırlığı: 462.49 g/mol



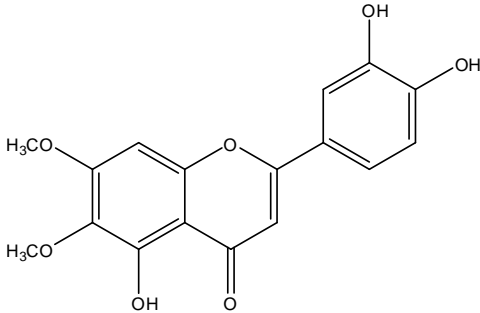
Alisin B (C₂₆H₃₄O₁₁)

Molekül ağırlığı: 522.21 g/mol



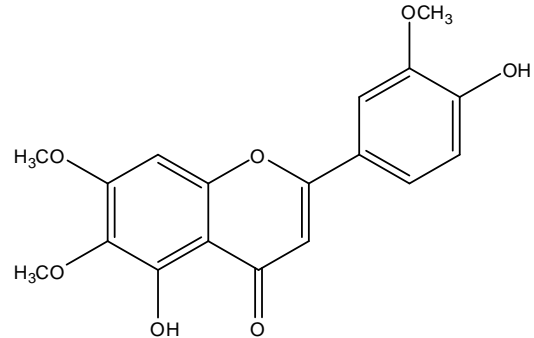
Sirsiliol (C₁₇H₁₄O₇)

Molekül ağırlığı: 330,29 g/mol



Sirsilineol (C₁₈H₁₆O₇)

Molekül ağırlığı: 344,32 g/mol



Şekil 3. *T. alysifolium*dan izole edilmiş olan diterpen ve flavonoid bileşiklerin molekül yapıları

Epidemiyolojik çalışmalar ve meta-analizler terpenler veya flavonoidlerce zengin diyetin yaşlanmanın beraberinde gelen kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, osteoporoz ve nörodejeneratif bozuklukların gelişimine ters etki ettiğini ortaya koymuştur. Bu bileşiklerin çeşitli hücre içi sinyal yolları aracılığıyla insüline duyarlı dokularda karbohidrat sindirimini, insülin salgılanmasını, insülin sinyali ve glikoz alımını düzenlediği gösterilmiştir.

Çeşitli değişik bitkilerden izole edilmiş terpenoid bileşiklerin anti-diyabetik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, tıbbi bitki *Andrographis paniculata*'nın ana biyoaktif bileşeni olan andrografolit'in (bir diterpenoittir) ve bir triterpen glikozit olan siatikozit'in (*Centella asiatica*'dan)

deneysel hayvan modellerinde anti-diyabetik etkisi gösterilmiştir (Nugriho vd., 2013). Aynı zamanda RTA 402 ve CDDO-metil ester olarak da bilinen ve sınıfının ilk oral olarak kullanılabilen sentetik triterpenoidi olan “Bardoxolone metil” bir diğer terpenoid hipoglisemik ajandır (Pergola vd., 2011a, 2011b). Bir başka triterpenoid olan betulinik asit, antiretroviral, anti-malaryal, anti-enflamatuar ve anti-kanser özellikleri yanı sıra anti-diyabetik özeliğe sahip olan doğal olarak meydana gelen bir pentasiklik triterpenoid bileşiktir (Genet vd., 2010). Benzer olarak, literatürde flavonoid bileşiklerin de anti-diyabetik etki gösterdiğini bildirir çalışmalar yer almaktadır (Nishi ve Mini, 2013; Babu vd., 2013; Constantin vd., 2014; Rahal vd., 2014). Turunçgillerden izole edilmiş olan naringenin flavonoid STZ ile indüklenmiş diyabet sıçanlarda kan glikoz ve insülin düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğü ve pankreatik koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Annadurai vd., 2012). Naringene benzer olarak trunçta bulunan bir diğer flavonoid olan hisperidinin de naringenin gibi anti-diyabetik etkiye sahip olduğu; her iki flavonoid bileşiğin glukoneogenetik yolağı inhibe ederek etki ettiği gösterilmiştir. (Toumi vd., 2009; Constantin vd., 2014). Farklı flavonoid bileşikler içinde anti-diyabetik etkiler litratürde bildirilmektedir (Zima vd., 2010; Cui vd., 2010; Habtemariam 2012; Mosihuzzman vd., 2013). Bu kapsamda, anti-diyabetik etkisi bilinen Teucrium cinsinin ülkemize endemik bir türü olan *T. alysiifolium*'dan izole edilmiş olan dört adet saf bileşiğin anti-hiperglisemik etkinliği öncelikle in vitro modellerde araştırılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Sarf Malzemeleri

1,1-Dimetilbiguanid hidroklorid (D150959), 3-İzobütil-1-metilksantin (I7018), 96 kuyucuklu mikropalakalar (Costar), (D-+)-Glikoz (G7021), Dekzametazon (D4902), Dimetil sülfoksit (D4540), İnsülin çözeltisi (I0516), Kalsiyum Klorid (C5670) L-Glutamin (G8540), Maltoz çözeltisi (63423), Sığır Serum Albumin (A4919), Sükroz (S1888), Tripan Mavisı çözeltisi (93595) Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Export Department, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen, Germany) firmasından; EasyScript™ Plus cDNA Sentez Kiti (G236) ve KiloGreen 2X qPCR (MasterMix-KS) ABM (Applied Biological Materials Inc., #1-3671 Viking Way, Richmond, BC, V6V 2J5 Canada) firmasından; Chang Liver (CCL-13), 3T3-L1 (CL-173), C2C12 (CRL-1772) ve BTC6 (CRL-11506) hücre hatları LGC (LGS Standards GmbH, Mercatorstr. 51, 46485 Wesel, Germany) firmasından; 50 nmol, Oligo-DNA (primerler) Genescript (GenScript, 860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA) firmasından; Fetal Sığır Serumı Gibco (Thermo Fisher Scientific, 81 Wyman Street, Waltham, MA 02451 USA) firmasından; Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, 12-741F), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, 17-513), Eagle's modified essential medium (EMEM, 12-662F), Penisilin- streptomisin Karışımı (17602), RPMI 1640 Besiyeri (12-702F) ve Tripsin-EDTA çözeltisi (17-161F) Lonza (Lonza Group Ltd, Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland) firmasından; insülin ELISA kiti (EZRMI-13K) Millipore (290 Concord Road, Billerica, Massachusetts 01821 USA) firmasından; RNeasy Plus Mini Kit (74136) Qiagen (27220 Turnberry Lane, Suite 200, Valencia, CA 91355, USA) firmasından; UltraFlux kapaklı PZR tüpleri (0,2 ml, 3247-40) SSI (Scientific Specialties, Inc., 1310 Thurman Street Lodi, CA 95240, USA) firmasından temin edilerek kullanıldı.

2.1.2. Cihazlar

Bu proje kapsamında başlıca şu cihazlar kullanılmıştır: Bioneer gerçek zamanlı PZR cihazı, Bios a kuru blok ısıtma termostadı, Maestrogen Nanodrop cihazı, Sigma 3K30 soğutmalı santrifüj, Sigma 1-14K soğutmalı/soğutmasız santrifüjler, Bioneer ExiSpin PCR tüp karıştırıcısı, Therm Agaroz jel elektroforez sistemi, DNR jel görüntüleme sistemi, Cisco laminar flow, Nuaire CO₂ inkübatör, Olympus ters mikroskop, Olympus CX31 mikroskop ve Thermo Scientific Multiskan GO mikropalaka okuyucu spektrofotometre.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre Hatlarının İdamesi

2.2.2. BTC6 Hücre Hattı

Hücreler %15 inaktive edilmiş FBS (fetal sığır serumu) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde, 37 °C de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 32 saat sonra %80 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1x10⁵ hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO (dimetilsülfoksit) içeren besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80 °C'de muhafaza edildi.

2.2.3. C2C12 Hücre Hattı

Hücreler %10 inaktive edilmiş FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde, 37 °C de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 48 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1x10⁵ hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO içeren besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80 °C'de muhafaza edildi.

2.2.4. 3T3L1 Hücre Hattı

Hücreler %10 inaktive edilmiş FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde, 37 °C de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 60 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1x10⁵ hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO içeren besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80 °C'de muhafaza edildi.

2.2.5. Chang karaciğer (HeLa) Hücre Hattı

Hücreler %10 inaktive edilmiş FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyerinde, 37 °C de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 36 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1x10⁵ hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO içeren besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80 °C'de muhafaza edildi.

2.2.6. Caco-2 Hücre Hattı

Hücreler %20 inaktive edilmiş FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyerinde, 37 °C de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 36 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisini ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1x10⁵ hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO içeren besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80 °C'de muhafaza edildi.

2.3. Test Bileşikleri – Alisin A, Alisin B, Sirsiliol ve Sirsilinol

2.3.1. İzolasyonu ve saflaştırılması

Test bileşikleri Topcu vd., (1995; 1996; 1997) tarafından belirtildiği şekilde .T. alyssifolium'dan izole edilmiş ve saflaştırılmış diterpenoid ve flavonoid yapıda bileşiklerdir. Bileşiklerin moleküler yapıları ve özellikleri Şekil 3'te verilmiştir. Bu çalışmada önceden izole edilmiş ve uygun şartlarda saklanmış bileşikler kullanıldı.

2.3.2. Model Mekanizma Deneylerinde Kullanılmak İçin Hazırlanışları

Tüm test bileşikleri son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde öncelikle DMSO içerisinde çözüldü ve son hacme de besiyeri ile tamamlandı. DMSO konsantrasyonu son hacimde %15 olacak şekilde ayarlandı. Çözünen bileşikler azot (N₂) gazı ile muamele edilerek ve temsili miktarlara bölünerek -20 °C de saklandı. Deney esnasında açılan temsili bölüntüler açılıp kullanıldıktan sonra tekrar kullanılmadı ve kalan miktarlar atıldı. Böylelikle bileşiklerin deneyler esnasında bozulmaları veya oksidasyona maruz kalmaları engellenmiş oldu.

2.4. Sitotoksikite Testleri

Bu işlem için hücreler 96 kuyulu plakalara, her kuyucukta 1 x 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve plakaların üzeri toplamda 200 µl olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. Hücrelerin plakaya yapışması için 24 saat CO₂ inkübatörde bekletildi. Bu süre sonunda besiyeri döküldü ve değişik konsantrasyonlarda saf bileşik kuyucuklara yüklendi. Kontrol grubuna ise sadece besi ortamı, çözücü veya pozitif kontrol madde ekledi. Tüm kuyucuklar 200 µl'ye besiyeri ile tamamlanarak 24 saat CO₂ inkübatörde bekletildi. Süre sonunda kuyucuklardaki ortam dökülerek her bir kuyucuğa 100 µl kristal viyole çözeltisi (%10 EtOH içinde %0,5'lik) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dak. bekletildi. Süre sonunda boya döküldü ve plaka çeşme suyunda boyanın fazlası gidene kadar yıkandı. Kuyucuklara 100 µl sodyum sitrat çözeltisi (%50 EtOH içinde çözdürülmüş, 1M, pH 4,2) eklendi. Oda sıcaklığında 15 dak. çalkalanarak 630 nm dalga boyunda ELISA mikroparka okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak yüzde yaşam verileri saptandı. Bu verilerden yaklaşık Hiçbir Etki Gözlemlenmeyen

Düzeyi (NOEL) ve En Düşük Etki Gözlemlenen Düzeyi (LOEL) değerleri saptanarak takip eden etki saptama deneylerinde kullanılmıştır.

2.4.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Ölçümü

Test bileşiklerinin sitotoksik etkilerini saptamanın yanısıra tespit edilen konsantrasyonlarda hücreler üzerine herhangi bir toksik etki olup olmadığını tespit etmek için hücrelerin test bileşiklerle birlikte inkübe edildiği besiyerlerinde ayrıca laktat dehidrogenaz ölçümü yapıldı. Bu amaçla, hücreler 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96'lı mikrolakaya ekildi. Ekimden 24 saat sonra uygulama yapıldı. Kuyucuklarda, ilgili hücrenin besiyeri (besiyeri kontrol), çözücü olarak kullanılan %15 DMSO içeren besiyeri (DMSO kontrol), Alisin A, Alisin B ve Sirsiliol, Sirsilineol (test bileşikleri) içerdi. Ortamdaki LDH aktiviteleri BioVision laktat dehidrogenaz aktivite tayin kiti ile kolorimetrik (Kat. No: K726-500) olarak tespit edildi. Kit bileşenleri ve protokolü aşağıdaki gibidir:

Tablo 1. BioVision LDH tayin kiti bileşenleri

Substrat karışımı: 1.1 ml ddH ₂ O ile 10 dak. boyunca çözüldü
LDH pozitif kontrol: 220 µl dH ₂ O ile sulandırılır
NADH standardı: 0,4 ml ddH ₂ O ile sulandırılır (1,25 mM)

Farklı içeriklere sahip kuyucuklardan 25'er µl örnek alınıp yeni bir plakaya eklendi ve son hacim 50 µl olacak şekilde analiz tamponu ile tamamlandı. Duplike olarak NADH standardından kuyucuklara sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl eklenip son hacim 50 µl olacak şekilde analiz tamponu ile tamamlandı. Her bir kuyucuğa içeriği aşağıdaki gibi olan reaksiyon karışımından 50 µl eklendi ve iyice karıştırıldı.

Analiz tamponu	48 µl
Substrat karışım solüsyonu	2 µl

İlk ölçüm reaksiyon karışımı eklendikten hemen sonra; ikinci ölçüm ise 37°C' de 30 dak. inkübe ettikten sonra yapıldı. Ölçümler 450 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

2.5. Glikoz Kullanım Testi

Glikoz alınımı deneyleri 3T3-L1*, C2C12 ve Chang hücre hatları ile gerçekleştirildi. Bu deneyler için taze olarak pasajlanmış hücreler 96 kuyucuklu mikrolakalara kuyucuk başına 4500 hücre olacak şekilde ekildi ve 48 saat boyunca büyütüldü. Bu süre sonunda besiyere 8 mM glikoz +% 0,1 BSA + test bileşik (aşağıda verilmektedir) eklendi ve 2 saatlik ilave bir süre daha inkübe edildi.



İnkübasyon süresi sonucunda her bir kuyucuktan 10 µl ortam alınarak yeni bir 96 kuyucuklu mikropalakaya transfer edildi. Üzerine glikoz reaktifi eklenerek son hacim 200 µl'ye tamamlandı ve 37 ° C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de okundu. Glikoz tayini esas olarak BioVision Kolorimetrik Glikoz Tayin Kiti (Kat. No: K606-100) kullanılarak, üreticinin direktiflerine uyularak tayin edildi.

Kuyucuklarda oluşturulan ortam aşağıdaki gibidir:

3T3 ve Chang Liver hücre hatları için;

Kontrol B (Besiyeri Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA
Kontrol C (DMSO Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + %15 DMSO içeren çözelti
Kontrol P1 (Pozitif Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 1 µM metformin
Kontrol P2 (Pozitif Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 1 µM İnsülin
Test 1 (Alisin A)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 40 µg/ml Alisin A
Test 1' (Alisin A)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 75 µg/ml Alisin A
Test 2 (Alisin B)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 40 µg/ml Alisin B
Test 2' (Alisin B)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 75 µg/ml Alisin B
Test 3 (Sirsiliol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 20 µg/ml Sirsiliol
Test 3' (Sirsiliol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 40 µg/ml Sirsiliol
Test 4 (Sirsilineol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 20 µg/ml Sirsilineol
Test 4' (Sirsilineol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 40 µg/ml Sirsilineol

*3T3L1 hücre hattı bu deney öncesinde adipoz hücrelerine dönüştürülür. Bunun için yapılması gerekenler aşağıda Bölüm 2.5.1'de verilmiştir.

C2C12 hücre hattı için;

Kontrol B (Besiyeri Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA
Kontrol C (DMSO Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + %15 DMSO içeren çözelti
Kontrol P1 (Pozitif Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 1 µM metformin
Kontrol P2 (Pozitif Kontrol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 1 µM İnsülin
Test 1 (Alisin A)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 20 µg/ml Alisin A
Test 1' (Alisin A)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 30 µg/ml Alisin A
Test 2 (Alisin B)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 20 µg/ml Alisin B
Test 2' (Alisin B)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 40 µg/ml Alisin B
Test 3 (Sirsiliol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 20 µg/ml Sirsiliol
Test 3' (Sirsiliol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 40 µg/ml Sirsiliol
Test 4 (Sirsilineol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 20 µg/ml Sirsilineol
Test 4' (Sirsilineol)	: 8mM glikoz +% 0,1 BSA + 40 µg/ml Sirsilineol

Kit bileşenleri ve prosedürü aşağıdaki gibidir:

Tablo 2. BioVision glikoz tayin kiti bileşenleri

Glikoz analiz tamponu
Glikoz probu
Liyofilize enzim karışımı
Glikoz standardı (100 nmol/μl)

Glikoz standardı glikoz analiz tamponu ile 10 kat seyreltildi. Duplike olarak kuyucuklara sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 μl eklendi ve üzerlerine son hacim 50 μl olacak şekilde analiz tamponundan eklendi. Böylece kuyucuklarda 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 nmol glikoz standardı oluşturuldu. Örneklerden 10'ar μl alındı ve üzerlerine son hacim 50 μl olacak şekilde analiz tamponundan eklendi. Test ve standart içeren kuyucuklar için reaksiyon karışımı kullanılırken; kontrol grupları için artalan kontrol karışımı kullanıldı. Aşağıda karışım içerikleri verilmiştir (bu hacimler bir kuyucuk içindir).

	Reaksiyon karışımı	Artalan karışımı
Glikoz analiz tamponu	46 μl	48 μl
Glikoz probu	2 μl	2 μl
Glikoz enzim karışımı	2 μl	-

Reaksiyon ve artalan karışımları ilgili kuyucuklara eklendikten sonra, plaka 37°C'de ışıktan korunaklı bir yerde 30 dakika bekletildi ve 570 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçümü yapıldı. Standart değerler kullanılarak oluşturulan grafik ve eğri değerleri kullanılarak bilinmeyen test miktarları hesaplandı.

2.5.1. Gliserol-3-Fosfat Dehidrogenaz Aktivite Ölçüm Testi

3T3L1 pre-adiposit hücreleri deksametason (DEX), izobutilmetilksantin (IBMX) veya insülin varlığında büyütüldüklerinde 5. gün sonrası yuvarlak bir morfolojiye sahip olmakta ve lipid biriktirmeye başlayarak adiposit karaktere sahip olmaktadır. Taze pasajlanmış 3T3L1 hücrelerinin ortamına birinci günün sonunda 10 μg/ml insülin, 10⁻⁸ M DEX ve 0.1mM IBMX eklenerek adiposit farklılaşması indüklendi. Beşinci günün sonunda hücreler yıkanarak normal ortama transfer edildi. Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (G3PDH) mRNA, protein ve aktivitesi adiposit farklılaşmasının bir göstergesi olarak kullanılır. Bunun için BioVision gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivite tayin kiti (kolorimetrik, Kat. No: K640-100) kullanılarak hücrelerin farklılaşması belirlendi. Kit bileşenleri ve prosedürü aşağıdaki gibidir:

Tablo 3. BioVision glikoz tayin kiti bileşenleri

GPDH analiz tamponu
GPDH substratı: 220 μl GPDH analiz tamponu ile sulandırılır
GPDH probu: 220 μl dH ₂ O ile sulandırılır
NADH standardı: 100 μl GPDH analiz tamponu ile sulandırılır (5 mM)

Yaklaşık 1×10^6 hücre 200 µl soğuk GPDH analiz tamponu ile 10 dak. boyunca, 10 kez insülin iğnesinden geçirilerek buz üstünde homojenize edildi. Homojenat 12000 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi ve santrifüj topandı. Örnekten 20 µl her bir kuyucuğa kondu ve üzerine son hacim 50 µl olacak şekilde GPDH analiz tamponu eklendi. Örnek içindeki NADH kaynaklı artalan oluşumu için kontrol oluşturuldu. Pozitif kontrol için 10 µl sulandırılmış GPDH pozitif kontrol eklendi ve son hacim GPDH analiz tamponu ile 50 µl' ye tamamlandı.

Stok NADH (5 mM) standardı GPDH analiz tamponu kullanılarak seyreltildi ve 1 mM NADH standardı elde edildi. Kuyucuklara sırasıyla 0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 12.5 µl seyreltilmiş 1 mM NADH standardı eklendi ve son hacim GPDH analiz tamponu ile 50 µl' ye tamamlandı. Standart, pozitif kontrol ve test örneklerinin bulunduğu kuyucuklara 50'şer µl reaksiyon karışımı; artalan kontrolü için oluşturulan kuyucuğa 50 µl artalan karışımı eklendi ve iyice karıştırıldı.

	Reaksiyon karışımı	Artalan karışımı
GPDH analiz tamponu	46 µl	48 µl
GPDH probu	2 µl	2 µl
GPDH substrat	2 µl	

Bekleme süresince plaka 37°C'de tutuldu ve 450 nm dalga boyunda 30 dakikada ölçüm alındı.

2.6. Glikoz Depolama Testi

Bu grup deneyler glikojen depolama kapasitesi olan C2C12 ve Chang hücre hatları ile gerçekleştirildi. Hücreler deney gününe kadar normal koşullarda büyütüldü. Deney gününde hücreler besiyer kalıntılarını gidermek için 37 °C olan fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve 2 saat serum içermeyen ortamda inkübe edildi. Daha sonra 3 saat boyunca aşağıda verilen ajanlar ile inkübe edildi. Kuyucuklarda oluşturulan ortam aşağıdaki gibidir:

C2C12 hücre hattı için;

Kontrol B (Besiyeri Kontrol)	: Besiyeri
Kontrol C (DMSO Kontrol)	: Besiyeri + %15 DMSO içeren Besiyeri
Kontrol P (Pozitif Kontrol)	: Besiyeri + 1 µM İnsülin
Test 1 (Alisin A)	: Besiyeri + 20 µg/ml Alisin A
Test 1' (Alisin A)	: Besiyeri + 30 µg/ml Alisin A
Test 2 (Alisin B)	: Besiyeri + 20 µg/ml Alisin B
Test 2' (Alisin B)	: Besiyeri + 40 µg/ml Alisin B
Test 3 (Sirsiliol)	: Besiyeri + 20 µg/ml Sirsiliol
Test 3' (Sirsiliol)	: Besiyeri + 40 µg/ml Sirsiliol
Test 4 (Sirsilineol)	: Besiyeri + 20 µg/ml Sirsilineol

Test 4' (Sirsilineol) : Besiyeri + 40 µg/ml Sirsilineol

Chang Liver hücre hattı için:

Kontrol B (Besiyer Kontrol) : Besiyeri
Kontrol C (DMSO Kontrol) : Besiyeri + %15 DMSO içeren KRBH
Kontrol P (Pozitif Kontrol) : Besiyeri + 1 µM Glibenklamid
Test 1 (Alisin A) : Besiyeri + 40 µg/ml Alisin A
Test 1' (Alisin A) : Besiyeri + 75 µg/ml Alisin A
Test 2 (Alisin B) : Besiyeri + 40 µg/ml Alisin B
Test 2' (Alisin B) : Besiyeri + 75 µg/ml Alisin B
Test 3 (Sirsiliol) : Besiyeri + 20 µg/ml Sirsiliol
Test 3' (Sirsiliol) : Besiyeri + 40 µg/ml Sirsiliol
Test 4 (Sirsilineol) : Besiyeri + 20 µg/ml Sirsilineol
Test 4' (Sirsilineol) : Besiyeri + 40 µg/ml Sirsilineol

İnkübasyon sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı. Hücre süspansiyonu bir hemositometre kullanılarak sayıldı ve $1,0 \times 10^6$ adet hücre ayrılıp santrifüj (4°C 'de 5 dak., 800xg) edildi. Oluşan pelet buz üstünde 200 µl distile su içerisinde homojenize edilerek yeniden süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon 18000xg'de 10 dak. santrifüj edildi ve üst fazdan 25 µl alınıp glikojen içeriği BioVision glikojen tayin kiti (Kat. No: K646-100) ile kolorimetrik olarak üreticinin direktifleri doğrultusunda tespit edildi. Kit bileşenleri ve prosedürü aşağıdaki gibidir:

Tablo 4. BioVision glikojen tayin kit bileşenleri

Hidroliz tamponu
Geliştirme tamponu
Oxired probu
Liyofilize hidroliz enzim karışımı
Liyofilize geliştirme enzim karışımı
Glikojen standardı (2,0 mg/ml)

Hidroliz enzim karışımı 220 µl hidroliz tamponuyla ve geliştirme enzim karışımı 220 µl geliştirme tamponu ile çözdürüldü. Standart dH₂O ile 10 kat seyreltildi ve kuyucuklara sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl eklendi. Son hacim hidroliz tamponu ile 50 µl'ye tamamlandı. Standart ve örnek kuyucuklarına 2 µl hidroliz enzim karışımı eklendi ve oda sıcaklığında 30 dak. bekletildi. Standart ve örnekleri içeren her bir kuyucuğa aşağıda içeriği verilen reaksiyon karışımı eklendi.

Gelişme tamponu	46 µl
Gelişme enzim karışımı	2 µl
OxiRed probu	2 µl

Plaka oda sıcaklığında ışıktan korunaklı bir yerde 30 dak. bekletildi ve 570 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçümü yapıldı.

2.7. Glikoz Taşınımı (Transport) Testi

Bu deneyler Caco-2 hücre hattı ile gerçekleştirildi. İnsan bağırsak epitel Caco-2 hücre hattı rutin olarak 4.5 g/L glikoz, 0.584 g/L glutamin, %10 fetal sığır serumu, %3,7 sodyum bikarbonat, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve %1 esansiyel olmayan amino asitler ihtiva eden DMEM besiyerinde kültüre edildi. Ortam, 2 günde bir değiştirildi ve hücreler her gün kontrol edildi. Artursson vd., (1990) tarif ettiği gibi, transport deneyleri için hücreler, polikarbonat filtreli hücre kültürü plakaları (Corning Transwell, 24-mm çap, 3 µm) içine ekildi ve birbirine yapışmış hale dönüşümleri beklendi (14 gün). Caco-2 hücrelerinin sıkı birleşimleri (sıkı bağların oluşumları) ve gelişme bütünlüğü mikroskopik inceleme ile takip edildi.

Caco-2 hücre katmanından glikoz taşınmasının ölçülmesi için öncelikle trans-kuyucukların her iki yanı 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 80 mM NaCl, 100 mM mannitol, 3 mM K₂HPO₄, 1 mM CaCl₂ ve 1 mg/ml BSA içeren inkübasyon tamponu ile yıkandı. Hücre tabakası 1 saat boyunca 37 °C'de inkübasyon tamponu içinde ön-inkübasyona maruz bırakıldı ve ortam transport deneyinden hemen önce taze inkübasyon tamponu ile değiştirildi. Transport deneyi apikal tarafa 25 mM D-glikoz ve test bileşiğin eklenmesi ile başlatıldı. Kuyucuklarda oluşturulan ortam aşağıdaki gibidir:

Kontrol B (Besiyeri Kontrol)	: Besiyeri
Kontrol C (DMSO Kontrol)	: Besiyeri + %15 DMSO içeren Besiyeri
Kontrol P (Pozitif Kontrol)	: Besiyeri + 1 µM İnsülin
Test 1 (Alisin A)	: Besiyeri + 20 µg/ml Alisin A
Test 1' (Alisin A)	: Besiyeri + 40 µg/ml Alisin A
Test 2 (Alisin B)	: Besiyeri + 20 µg/ml Alisin B
Test 2' (Alisin B)	: Besiyeri + 40 µg/ml Alisin B
Test 3 (Sirsiliol)	: Besiyeri + 20 µg/ml Sirsiliol
Test 3' (Sirsiliol)	: Besiyeri + 40 µg/ml Sirsiliol
Test 4 (Sirsilineol)	: Besiyeri + 20 µg/ml Sirsilineol
Test 4' (Sirsilineol)	: Besiyeri + 40 µg/ml Sirsilineol

Apikal ve bazolateral bölümden 0., 30. ve 60. dakikalarda 10 µl çözelti örnekleri alınıp ve yerlerine glikoz içermeyen inkübasyon çözeltisi eklendi. Alınan örneklerde glikoz miktarı Bölüm 2.5'te belirtildi gibi BioVision Glikoz tayin kiti (Kat. No: K606-100) ile üreticinin talimatları doğrultusunda kolorimetrik olarak tayin edildi.

2.8. Glikoz Emilimi Testi

Deney Caco-2 hücre hattı ile gerçekleştirildi. Bu bölüm deney yukarıda Bölüm 2.5'te verilen hücre büyütme koşullarında Huang vd.'lerinin (2012) tanımladığı şekilde gerçekleştirildi.

Caco-2 hücrelerinde alfa-glikosidaz etkinliğini belirlemek için öncelikle trans-kuyucuklar fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Hücre tabakası 1 saat boyunca 37 °C'de PBS içinde ön-inkübasyona maruz bırakıldı. Apikal taraftaki ortam 28 µM maltoz, 28 µM sukroz ve test bileşiği içeren PBS ile değiştirilerek deney başlatıldı. Bazal tarafa sadece PBS eklendi. Kuyucuklarda oluşturulan ortam aşağıdaki gibidir:

Kontrol B (Besiyer Kontrol)	: PBS
Kontrol C (DMSO Kontrol)	: PBS + %15 DMSO içeren PBS
Kontrol P (Pozitif Kontrol)	: PBS + 1 µM Glibenklamid
Test 1 (Alisin A)	: PBS + 20 µg/ml Alisin A
Test 1' (Alisin A)	: PBS + 40 µg/ml Alisin A
Test 2 (Alisin B)	: PBS + 20 µg/ml Alisin B
Test 2' (Alisin B)	: PBS + 40 µg/ml Alisin B
Test 3 (Sirsiliol)	: PBS + 20 µg/ml Sirsiliol
Test 3' (Sirsiliol)	: PBS + 40 µg/ml Sirsiliol
Test 4 (Sirsilineol)	: PBS + 20 µg/ml Sirsilineol
Test 4' (Sirsilineol)	: PBS + 40 µg/ml Sirsilineol

Hücreler bu koşullarda 2 saat inkübe edildikten sonra apikal taraftan 50 µl örnek alınarak alfa-glikosidaz tarafından salınan glikoz miktarı BioVision Glikoz analiz kiti ile üreticinin talimatları doğrultusunda kolorimetrik olarak bölüm 2.5'te belirtildiği gibi aynen uygulanarak tayin edildi.

2.9. İnsülin Salınım Testi

Taze pasajlanan BTC6 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaya ekildi ve 2 gün boyunca uygun şartlarda inkübe edildi. Süre sonunda, her bir kuyucuk 200 µl Krebs-Ringer-Bikarbonat-HEPES tamponu (KRBH: 118,4mM NaCl, 4,75mM KCl, 1,192mM MgSO₄, 2,54mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 2 mM NaHCO₃, % 0,1 BSA) ile iki kez yıkandı. Her bir kuyucuğa tekrar 200 µl KRBH tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika daha inkübe edildi. Süre sonunda ortam uzaklaştırıldı ve kuyucuklar aşağıda belirtilen şekilde tampon ve test bileşiği içeren ortamda oda sıcaklığında 40 dak. bekletildi:

Kontrol B (Besiyer Kontrol)	: KRBH
Kontrol C (DMSO Kontrol)	: KRBH + %15 DMSO içeren KRBH
Kontrol P (Pozitif Kontrol)	: KRBH + 1 µM Glibenklamid
Test 1 (Alisin A)	: KRBH + 20 µg/ml Alisin A
Test 1' (Alisin A)	: KRBH + 40 µg/ml Alisin A
Test 2 (Alisin B)	: KRBH + 20 µg/ml Alisin B
Test 2' (Alisin B)	: KRBH + 40 µg/ml Alisin B



Test 3 (Sirsiliol)	: KRBH + 20 µg/ml Sirsiliol
Test 3' (Sirsiliol)	: KRBH + 40 µg/ml Sirsiliol
Test 4 (Sirsilineol)	: KRBH + 20 µg/ml Sirsilineol
Test 4' (Sirsilineol)	: KRBH + 40 µg/ml Sirsilineol

Bekleme süresinin ardından her bir kuyucuk ortamından ayrı ayrı 10 µl başka yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Ortamdaki insülin miktarı Millipore İnsülin ELISA Kiti (kolorimetrik) (Kat. No: EZRMI-13K) kullanılarak ve üreticinin direktifleri uygulanarak gerçekleştirildi. Kit bileşenleri ve prosedürü aşağıdaki gibidir:

Tablo 5. Millipore insülin ELISA kit bileşenleri

İnsülin ELISA plakası
Yapışkan plaka kaplayıcı
10X yıkama tamponu
İnsülin standartları (0,2- 0,5- 1- 2- 5- 10 ng/ml)
Kalite kontrol 1 ve 2
Matriks çözeltisi
Analiz tamponu
İnsülin belirleme antikoru
Enzim çözeltisi
Substrat çözeltisi
Durdurma tamponu

Reaktifler deneye başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi. 10X yıkama tamponu ihtiyaca göre hesaplanarak 10 kat seyreltilerek kullanıldı. Gereken sayıda mikrotitre analiz plaka şeritleri çıkarıldı. Her kuyucuk 300 µl seyreltilen yıkama tamponu ile yıkandı (Bu işlem 3 kez tekrar edildi). Yıkama tamponu dikkatle dökülerek tamamen boşaltmak için temiz bir kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip nazikçe birkaç kez pat patlandı. Fakat kuyucukların tamamen kurummasına müsaade edilmedi. Her bir kuyucuğa 10 µl analiz tamponu eklendi. Kör kuyucuğuna 10 µl daha analiz tamponu eklendi. 10 µl sıçan insülin standartları artan konsantrasyonda duplike olarak ilgili kuyucuklara uygulandı. İlgili kuyucuklara kontrol-1 ve kontrol-2 solüsyonlarından 10 µl eklendi. Kalan kuyucuklara analiz edilmek istenen örnekten 10 µl eklendi. Bütün kuyucuklara 80 µl belirleme antikoru eklenip şeritler yapışkan filmler ile kapatılarak 400-500 rpm'de oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki solüsyon dökülerek her bir kuyucuk 300 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Bu yıkama işlemi 3 kez daha tekrar edildi. Her kuyucuğa 100 µl enzim çözeltisi eklendi. Kuyucuklar yapışkan film ile kapatıldı ve orta hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dak. inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki sıvı döküldü ve daha önce belirtildiği şekilde yıkama tamponu ile 6 kez yıkandı. Son olarak her bir kuyucuğa 100 µl

substrat solüsyonu eklenerek kuyucuklar kapatıldı ve 20 dak. çalkalanarak inkübe edildi. Standartların bulunduğu kuyucuklar da artan insülin konsantrasyonlarına göre mavi renk oluşumu gözlemlendi. Ardından kuyucuklara 100 µl durdurma çözeltisi eklendi ve kuyucuklar çözeltinin karıştığına emin oluncaya kadar elde çalkalandı. Bu esnada mavi renk sarıya döner ve 5 dak. içinde 450 ve 590 nm dalga boylarında absorbanslar okundu. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri çizilerek bilinmeyenler hesaplandı.

2.10. İnsülin Sinyal Yolağı Analizleri

İnsülin sinyal yolağı gen ifade düzeylerinin tespiti uygun hücre hatlarında ilgili test bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda uygulamaları neticesinde elde edilen hücrelerde aşağıdaki yöntemler uygulanarak saptanmıştır. Test bileşiklerin uygulama şekilleri bölüm 2.4'te sitotoksinite testlerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

2.10.1. RNA İzolasyonu

İzolasyon QIAGEN RNeasy Plus mini kit (Kat.No: 74136-250) kullanılarak laboratuvarımızda optimize ettiğimiz şekliyle aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi.

Tablo 6. QIAGEN RNeasy Plus mini kit bileşenleri

RLT Plus lizis tamponu
RW1 Yıkama tamponu
RPE Yıkama tamponu
RNazdan arındırılmış su
gDNA tutan kolon
RNeasy kolon

Hücreler besiyerinden uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi ortamın besiyerinden arındığına kanaat getirilene kadar tercihe göre birkaç kez yapıldı (genelde 3 kez). Yıkama işleminin ardından hücre yoğunluğuna göre 350-600 µl RLT plus tamponu eklendi. Bu işlem neticesinde hücreler mukusumsu bir yapı kazanır, yumuşar ve kolayca kazanır hale gelir. Lizis tamponu *hücre kazıyıcı* ile iyice hücreler üzerine yayıldı ve toplanıp ependorfa alındı. Birkaç kez yavaşça alt üst edildi. Süspansiyon gDNA eliminatör kolonuna alındı. 100 rpm de 1 dak. santrifüj edildi ve sıvı kısım kolondan geçmediyse işlem daha yüksek hızda veya daha uzun süre tekrarlandı. Kolon atıldı ve alta geçen kısmın üzerine 500 µl %70'lik EtOH eklendi. Yavaşça pipetaj yapıldı ve iyice karıştırıldı. Sıvıdan maksimum 600 µl "RNeasy spin" kolona aktarıldı. Kalan sıvı olursa bu işlem tekrar edilir. 11000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi ve sıvı kısım kolondan geçmediyse işlem daha yüksek hızda veya daha uzun süre tekrarlandı. Alta geçen kısım döküldü ve kolona 700 µl RW1 tamponu eklendi. 11000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi ve tekrar alta geçen kısım döküldü. Kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 11100 rpm'de

1 dak. santrifüj edildi ve tekrar allta geçen kısım döküldü. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi. Kolon bir şey eklenmeden 11000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon yeni bir ependorfa alındı ve üzerine 45 µl RNaz içermeyen su eklenerek 9000 xg' de 1 dak. 15 sn santrifüj edildi. Kolon atılır ve RNA bulunan ependorf etiketlenerek ve temsili bölüntülere bölünerek -80 °C'ye kaldırıldı.

İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel hazırlanarak Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek kalite kontrolleri gerçekleştirildi. %1'lik agaroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. 2 µL RNA örneği, 6 µL steril su ve 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip "DNR LightBis Prolmage Analysis System" (DNR Bioluminescence System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı. Ayrıca nanodrop cihazı ile de konsantrasyonları da tespit edilerek cDNA sentezi için kullanıldı.

2.10.2. cDNA Sentezi

Nanodrop cihazında konsantrasyonları belirlenen yüksek kaliteli total RNA'lar kullanılarak ABM cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bir PCR tüpü içerisinde 2,5 µg total RNA kit içerisindeki oligo d(T) primerleri (1µl), dNTP çözeltisi (1µl) ve RNaz içermeyen su (bu aşamada son hacim 14,5 µl olacak şekilde eklendi) ile karıştırılarak 65 °C de 5 dak. ön işleme tabi tutuldu. Ardından bu karışım yine kit içeriğinde yer alan reaksiyon tamponu (4µl), RNaz inhibitörü (0,5 µl) ve "EasyScript RTase" enzimi (1µl) ile birleştirildi. Böylece bir tüpteki son hacim 20 µl oldu ve 50°C de 50 dak. inkübasyon cDNA sentezlendi. Süre sonunda, enzim inhibe edilmek üzere 85 °C'de 5 dak. bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar temsili bölüntülere bölünerek gerçek zamanlı nicel PZR (qRT-PCR) yapmak üzere -80 °C muhafaza edildi.

2.10.3. Gerçek Zamanlı Nicel PZR (qRT-PCR)

Elde edilen cDNA su ile 5 kat seyreltildi. Floresans boya olarak "ABM- KiloGreen 2X qPCR MasterMix RT²-PCR Master Mix" kullanıldı. Deney ortamı, her tüp için, son hacim 25 µl olacak şekilde aşağıda verildiği gibi oluşturuldu.

Su	:	6,1 µl
Forward Primer	:	0,7 µl
Reverse Primer	:	0,7 µl
Kilogreen	:	12,5 µl
cDNA	:	5 µl

Bu kapsamda incelenecek genler ve primer sekansları aşağıdaki Tablo 7'de verilmiştir:

Tablo 7. Analiz edilen diyabet ilişkili genlerin primer dizileri ve bilgileri.

Gen Kısa Adı/Adı (ing)	Primer F (5'→3') bç, Tm, Lokasyon	Primer R(5'→3') bç, Tm, Lokasyon	Amplikon (bç)
hIRSR insülin reseptör	AAAACGAGGCCCGAAGATTTTC 21 60.9 199-219	GAGCCCATAGACCCGGAAG 19 61.2 288-270	90
mIRSR	ATGGGCTTCGGGAGAGGAT 19 62.1 1-19	CTTCGGGTCTGGTCTTGAACA 21 61.7 214-194	214
hIRS-1 insulin reseptör substratı 1	ACAAACGCTTCTTCGTACTIONG 21 61.2 77-97	AGTCAGCCCCGCTTGTGATG 20 62.8 232-213	156
mIRS-1	CGATGGCTTCTCAGACGTG 19 60.2 21-39	CAGCCCGCTTGTGATGTTG 20 62.2 229-210	209
IRS-2 insulin reseptör substratı 1	CGGTGAGTTCTACGGGTACAT 21 61.0 1608-1628	TCAGGGTGTATTCATCCAGCG 21 61.6 1801-1781	194
mIRS-2	ACCGACTTGGTCAGCGAAG 19 61.9 418-436	CACGAGCCCGTAGTTGTCAT 20 61.9 552-533	135
hPI3K phosphatidilinositol 3-kinaz	ACCACTACCGGAATGAATCTCT 22 60.3 1217-1238	GGGATGTGCGGGTATATTCTTC 22 60.3 1423-1402	207
mPI3K	ACACCACGGTTTGGACTATGG 21 62 5-25	GGCTACAGTAGTGGGCTTGG 20 62 144-125	140
hPKL piruvat kinaz karaciğer	TCAAGGCCGGGATGAACATTG 21 62.7 230-250	CTGAGTGGGGAACCTGCAAAG 21 62.9 347-327	118
mPKL	GAACATTGCACGACTCAACTTC 22 60.0 243-264	CAGTGCATATCTCGGGACC 19 61.9 400-382	158
hPKM piruvat kinaz kas	ATGTGGAAGCCCATAGTGAA 21 60.9 1-21	TGGGTGGTGAATCAATGTCCA 21 61.4 118-98	118
mPKM	CGCCTGGACATTGACTCTG 19 60.2 94-112	GAAATTCAGCCGAGCCACATT 21 61.3 228-208	135
hFBP1 fructoz-1,6- bisfosfaz 1	CGCGCACCTCTATGGCATT 19 62.8 162-180	TTCTTCTGACACGAGAACACAC 22 60.2 297-276	136
mFBP1	TATGGTGGAAAGGGACGGGAA 21 62.6 128-148	CCTCTGGTGATACTCAAGGATGG 23 61.5 233-211	285
hG6P glikoz 6 fosfataz	CGAGGCGCTACAGAACCAG 19 62.4 36-54	CACTCGGTGATGAGGCTGAT 20 61.4 197-178	162
mG6P	CTGAGCGCGGGCATCATAAT 20 62.8 13-32	GATTCTTAGGATCGCCCAGAAAG 23 60.5 112-90	100
hPEPCK fosfoenolpiruvat karboksikinaz	AAAACGGCCTGAACCTCTCG 20 62.4 17-36	ACACAGCTCAGCGTTATTCTC 21 60.1 114-94	98

mPEPCK	CTGCATAACGGTCTGGACTTC 21 60.4 13-33	CAGCAACTGCCCGTACTCC 19 62.7 171-153	159
haG (hSIS) sukraz izomaltaz	TCCAGCTACTACTCGTGTGAC 21 60.6 141-161	CCCTCTGTTGGGAATTGTTCTG 22 60.8 257-236	117
maG (mSIS)	TGGCCGTGATGACAACAGTG 20 62.7 393-412	GCGCGAGACTAACTTTATCCGA 22 62.1 586-565	194
hAKR1B1 aldo-keto redüktaz ailesi 1, üye B1	TTTTCCCATTGGATGAGTCGG 21 60.0 365-385	CCTGGAGATGGTTGAAGTTGG 21 60.3 499-479	135
mAKR1B10	CTAGTGCCAAACCAGAGGACC 21 62.1 656-676	TCCTGTATTGAGAAGGTGTCA 22 60.2 815-794	160
hSLC2A1 (GLUT1) çözünen taşıyıcı ailesi 2 üye 1	GGCCAAGAGTGTGCTAAAGAA 21 60.2 669-689	ACAGCGTTGATGCCAGACAG 20 62.8 869-850	221
mSLC2A1 (GLUT1)	CAGTTCGGCTATAAACTGGTG 22 60.7 73-94	GCCCCGACAGAGAAGATG 19 61.8 228-210	156
hSLC2A2 (GLUT2) çözünen taşıyıcı ailesi 2 üye 2	GCTGCTCAACTAATCACCATGC 22 61.8 265-286	TGGTCCCAATTTTGAAAACCCC 22 61.2 447-426	183
mSLC2A2 (GLUT2)	TCAGAAGACAAGATCACCGGA 21 60.2 4-24	GCTGGTGTGACTGTAAGTGGG 21 62.6 218-198	215
hSLC2A3 (GLUT3) çözünen taşıyıcı ailesi 2 üye 3	GCTGGGCATCGTTGTTGGA 19 62.9 477-495	GCACTTTGTAGGATAGCAGGAAG 23 60.7 599-577	123
mSLC2A3	ATGGGGACAACGAAGGTGAC 20 61.8 1-20	GTCTCAGGTGCATTGATGACTC 22 60.7 107-86	107
hGLUT4 çözünen taşıyıcı ailesi 2 üye 4	TGGGCGGCATGATTTCTC 19 62.4 269-287	GCCAGGACATTGTTGACCAG 20 60.9 356-337	88
mGLUT4	AACTGGTCCTAGCTGTATTCT 22 60.0 67-88	CCAGCCACGTTGCATTGTA 19 60.7 184-166	118
hGLUT5 çözünen taşıyıcı ailesi 2 üye 5	ACGTTGCTGTGGTCTGTAACC 21 62.5 202-222	CATTAAGATCGCAGGCACGATA 22 60.3 348-327	147
mGLUT5	CCAATATGGGTACAACGTAGCTG 23 60.7 87-109	GCGTCAAGGTGAAGGACTCAATA 23 62.2 202-180	116
hSLC5A1 (SLGT1) çözünen taşıyıcı ailesi 5 (sodyum/glikoz co- taşıyıcı), üye 1	TACCTGAGGAAGCGTTTGGGA 21 62.9 10-30	CGAGAAGATGTCTGCCGAGA 20 61.1 111-92	102
mSLC5A1	AATGCGGCTGACATCTCAGTC 21 62.5 73-93	ACCAAGGCGTTCCATTCAAAG 21 61.1 320-300	248

hSLC5A4 çözünen taşıyıcı ailesi 5 (sodyum/glikoz co- taşıyıcı), üye 4 (SGLT2)	AGGAGTCGCCACCGTAACA 19 62.9 282-300	AGATATTCCGGCATGGTCATCA 22 61.0 395-374	114
mSLC5A4	ATGGAGCAACACGTAGAGGC 20 61.9 1-20	ATGACCAGCAGGAAATAGGCA 21 61.2 104-84	104
hLDHA laktat dehydrogenaz A	ATGGCAACTCTAAAGGATCAGC 22 60.1 1-22	CCAACCCCAACAACCTGTAATCT 22 60.2 86-65	86
mLDHA	TGTCTCCAGCAAAGACTACTGT 22 60.7 318-339	GACTGTACTTGACAAATGTTGGGA 23 60.2 472-450	155
hACTB Aktin Beta			
mACTB			

*h (human) – insan
m (mouse) – fare

2.11. Test Bileşiklerin Kansere İlişkili Genlerin İfade Düzeylerine Etkilerinin Saptanması

B-planı kapsamında anti-kanser etki tayinleri için kullanılan gen ve primerler de aşağıdaki Tablo 8’de verilmiştir. Bu bölümde kullanılan yöntemler primerler hariç aynen yukarıda Bölüm 2.12 verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 8. Çalışılan kanser ilişkili genler için kullanılan primer dizileri ve bilgileri.

Gen Kısa Adı Adı	PrimerF (5'→3') bp, Tm, Lokasyon	PrimerR (5'→3') bp, Tm, Lokasyon	Amplikon (çp)
PCNA Prolifere Edici Çekirdek Antijeni	CGTAGCAGAGTGGTCGTTGT 20 62 60-79	TAGCTGGTTTCGGCTTCAGG 20 62 151-132	91
EXO1 Ekzonükleaz 1	GCAAGTTACCCGTGTTCTGC 20 62 35-54	CCCATTCCAGACGACAGTT 20 62 192-173	157
C-MYC Miyelositomatozis Viral Onkogen Homologu	TCCATGAGGAGACACCGCC 19 62 1289-1307	GCTGTGAGGAGGTTTGCTGT 20 62 1449-1430	160
BCL2 B-Hücre CII/Lemfoma 2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC 22 62 962-983	TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC 24 62 1157-1134	195
KRAS	CTCGACACAGCAGGTCAAGA 20 62 316-335	GGCATCATCAACACCCTGTC 20 62 615-596	299

Kirsten Sıçan Sarkoması Viral Onkogen Homologu			
BAX Bcl2-İlişkili X Protein	AGAGGATGATTGCCGCCGT 19 62 242-260	CAACCACCCTGGTCTTGGATC 21 62 485-465	243
APAF1 Apoptotik Peptidaz Active Edici Faktör 1	GTCTGCTGATGGTGAAGGA 20 61 718-737	GATGGCCCGTGTGGATTTC 19 61 818-800	100
UNG Urasil-Dna Glikosilaz	CTGTGCAGGGTCCAGTC 19 61 53-71	AAGGCAGAAGACGCCCATTT 20 61 227-208	174
BRCA1 Göğüs Kanseri 1, Erken Başlangıç	CTTAGCGGTAGCCCCTTGG 19 61 33-51	CGCGCAGTCGCAGTTTTAAT 20 61 109-90	76
LIG1 Ligaz I, DNA, ATP-Bağımlı	CCTCACAGAGGCTGAAGTG 19 61 562-580	AGGTCTTTAGGGGCTTGGA 20 61 644-625	82
CASP3 Kaspaz 3, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz	GCAGCAAACCTCAGGAAAC 20 61 408-427	TGTCGGCATACTGTTTCAGCA 21 61 882-862	474
CASP9 Kaspaz 9, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz	GGCTGTCTACGGCACAGATGGA 22 61 783-804	CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG 21 61 982-962	199
P53 (Tümör Protein P53)	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT 23 61 366-388	GTGGTACAGTCAGAGCCAACC 21 61 574-554	208
CASP8 Kaspaz 8, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz	TCTGGAGCATCTGCTGTCTG 20 59 135-154	CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT 20 59 561-542	426
RB1 Retinoblastoma 1	ATCTATATTTACCCCTGAAGAG TC 25 59 2164-2188	TTCAGAAGGTCTGCCAACACCAAC A 26 59 2199-2223	35
PTEN Fosfataz Ve Tensin Homolog	CCCAGACATGACAGCCATC 19 58,5 706-724	TCTGCAGGAAATCCCATAGC 20 58,5 831-813	125
ERK2	CATCGCCGAAGCACCATTCAAG 22 55,5 1209-1230	GATAAGCCAAGACGGGCTGGAG 22 55,5 1427-1406	218

Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz 1			
CDK2 Siklinin-Bağımlı Kinaz 2	GCTAGCAGACTTTGGACTAGCCA G 24 64 666-689	AGCTCGTACCACAGGGTCA 19 64 744-731	78
CDK4 Siklinin-Bağımlı Kinaz 4	ATGTTGTCCGGCTGATGGA 19 64 501-519	CACCAGGGTTACCTTGATCTCC 22 64 568-547	67
HRAS Harvey Sıçan Sarkomasi Viral Onkogen Homologu	ACCCGGCAGGGAGTGGAGGAT 21 73 630-650	CATCAGGAGGGTTCAGCTTCCGC 23 73 714-692	84
TOP1 Topoizomeraz (DNA)	GGTAGCAGCCTCAGCCGTTT 20 56 82-101	AAATCCGCTTCGATCTGGGAAT 22 56 293-272	211

2.12. İstatiksel analizler

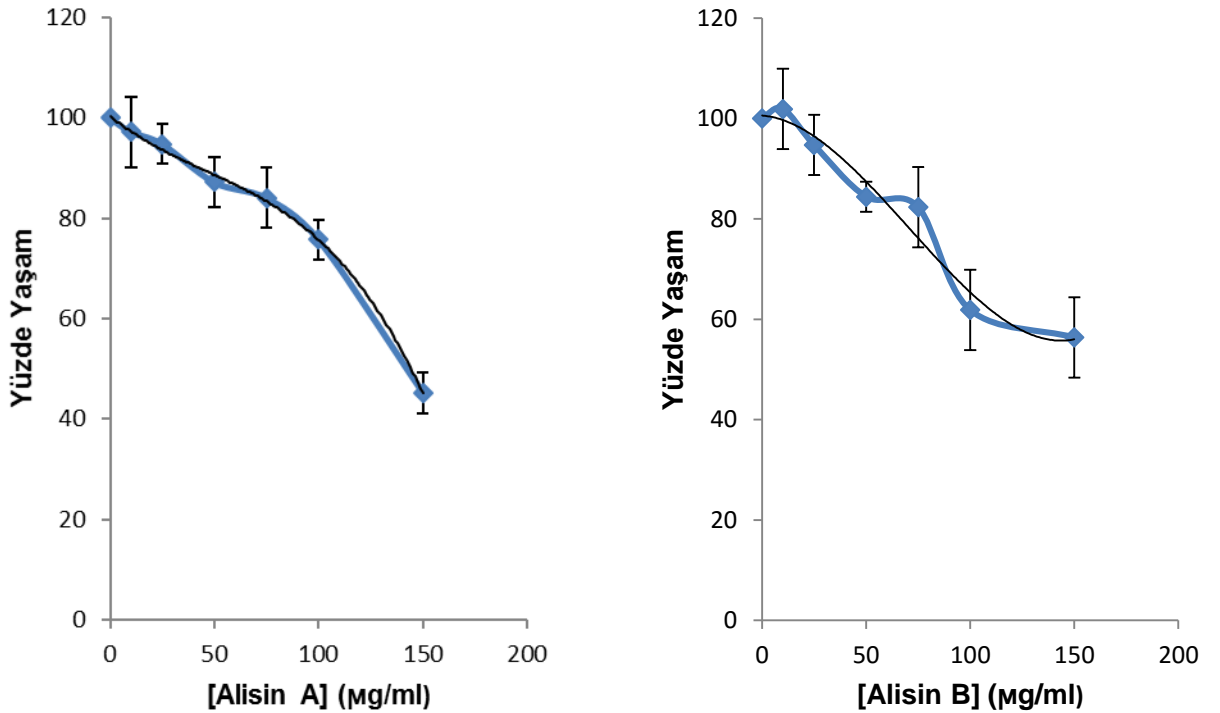
İstatistiksel analizler, Windows için GraphPad Prism 6.0 istatistiksel yazılım paketi kullanarak, öğrenci t-testi ile yapıldı. $P < 0,05$ anlamlılık düzeyi seçilerek değerler Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edildi. qRT-PCR verilerinin analizleri Qiagen firmasının ücretsiz olarak sağladığı RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis v3.4 ile web üzerinden çevirimiçi gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

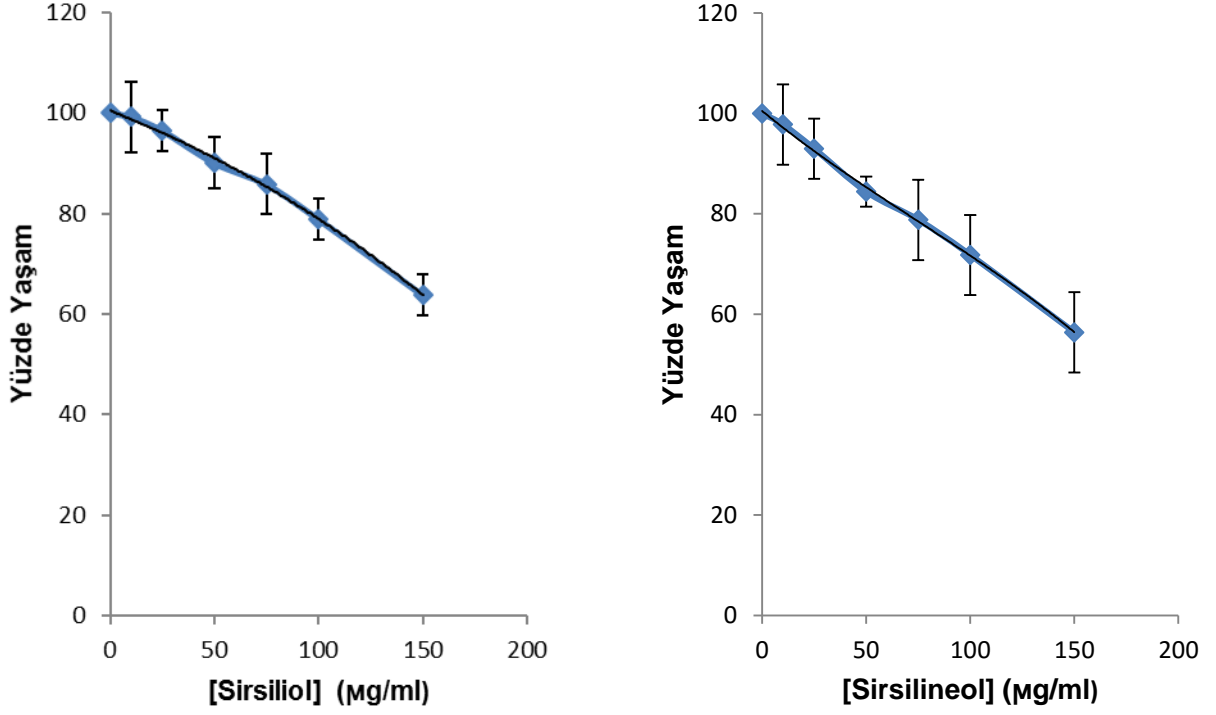
Proje kapsamında elde edilen veriler tekrarlanan deneylerin ortalama \pm standard sapma değerleri şeklinde verilmiştir. Aksi belirtilmediği sürece tüm veriler her birinde triplike yapılan en az üç bağımsız tekrar deneylerin ortalaması şeklindedir.

3.1. Sitotoksosite Testi

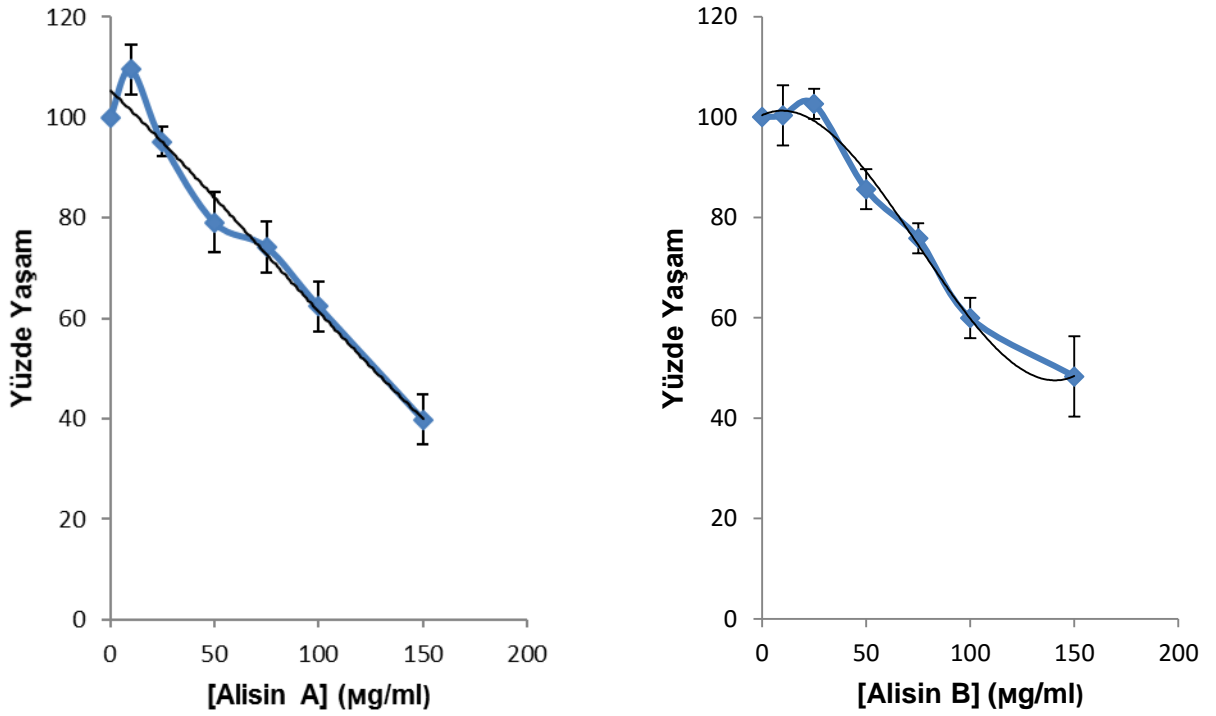
Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Alisin A, Alisin B, Sirsiliol ve Sirsilineol fraksiyonları sırasıyla %10, %10, ve %15 ve %15 DMSO' da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1×10^4 hücre/kuyucuk) ekilen BTC6, C2C12, 3T3L1, Chang Liver ve Caco-2 hücre dizileri 24 saat süresince bu fraksiyonlara maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki hücreler üzerine 100 μ l kristal viyole solüsyonu eklenerek hücrelerin yaşam oranları ELISA okuyucu kullanılarak ölçüldü. Kontrol grupları ve değişik dozlardaki test bileşiklerinin (Alisin A, Alisin B Sirsiliol ve Sirsilineol) hücre canlılığına etkileri belirlendi (Şekil 4-13).



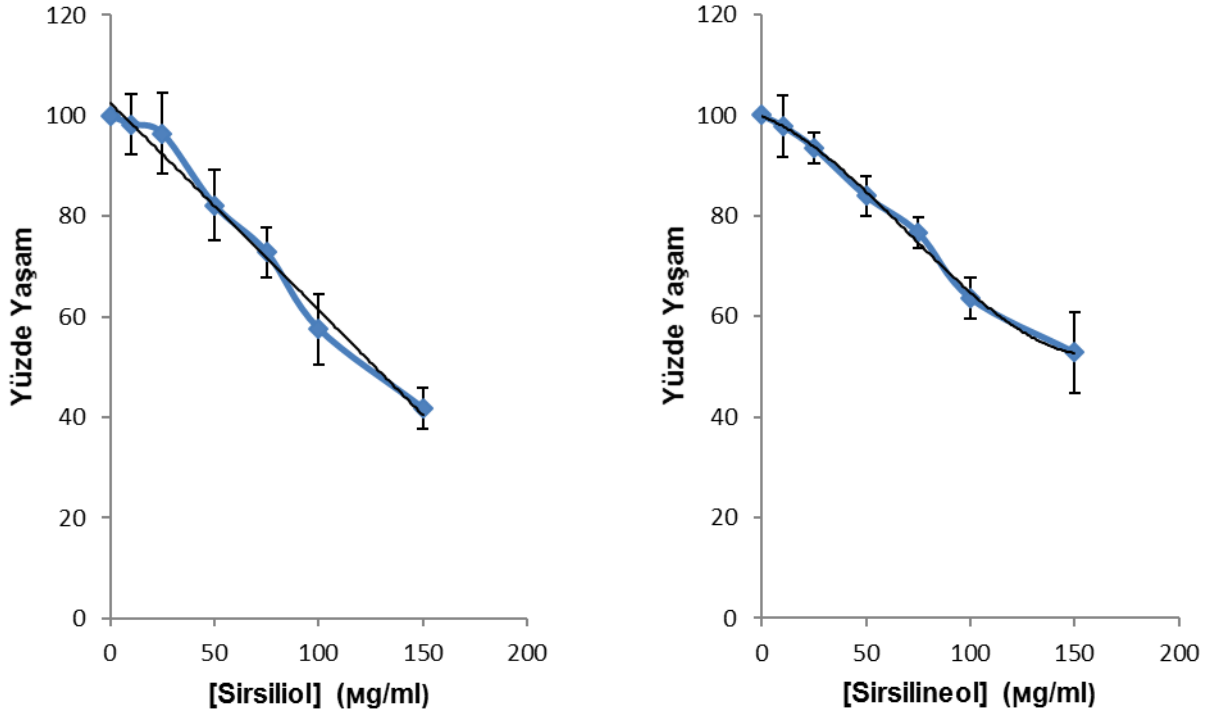
Şekil 4. BTC6 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi. Şekilde deneysel verilerin sonucu elde edilen eğri mavi renkle verilirken hesaplanan en iyi uyan eğri de ince ve siyah renkte gösterilmiştir. Bu kodlama benzer olarak takip eden 9 şekilde de aynen kullanılmıştır.



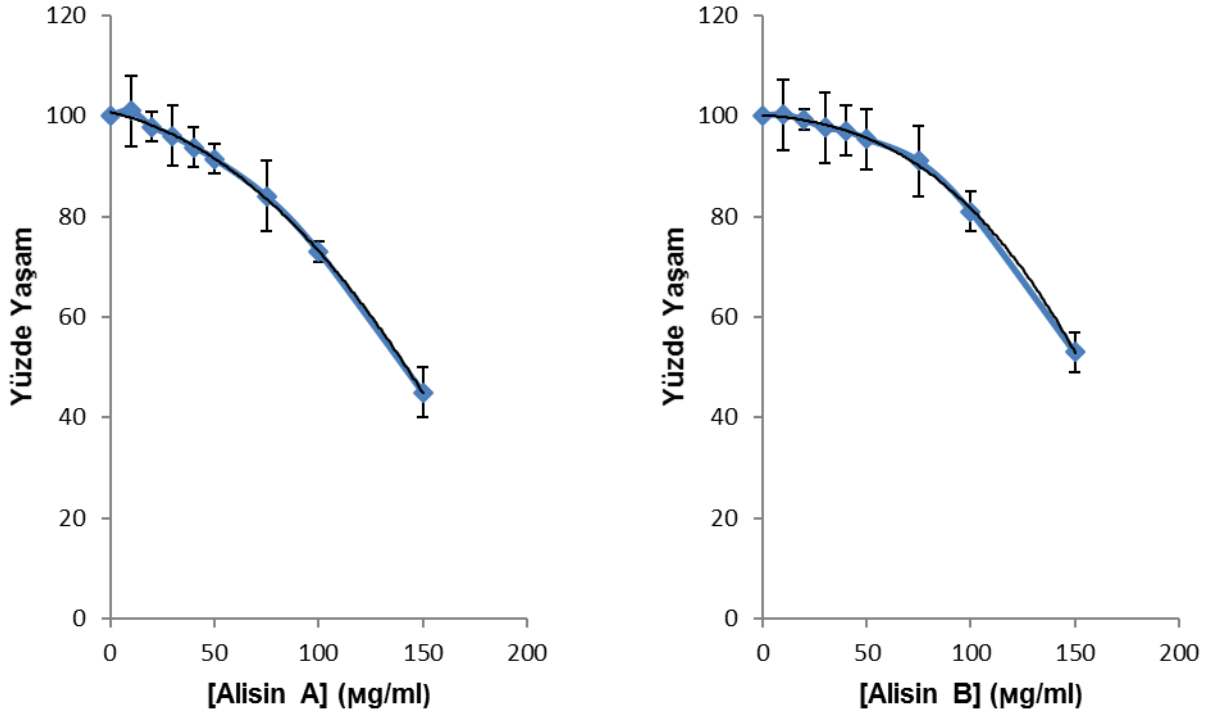
Şekil 5. BTC6 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilinol'ün hücre canlılığına etkisi.



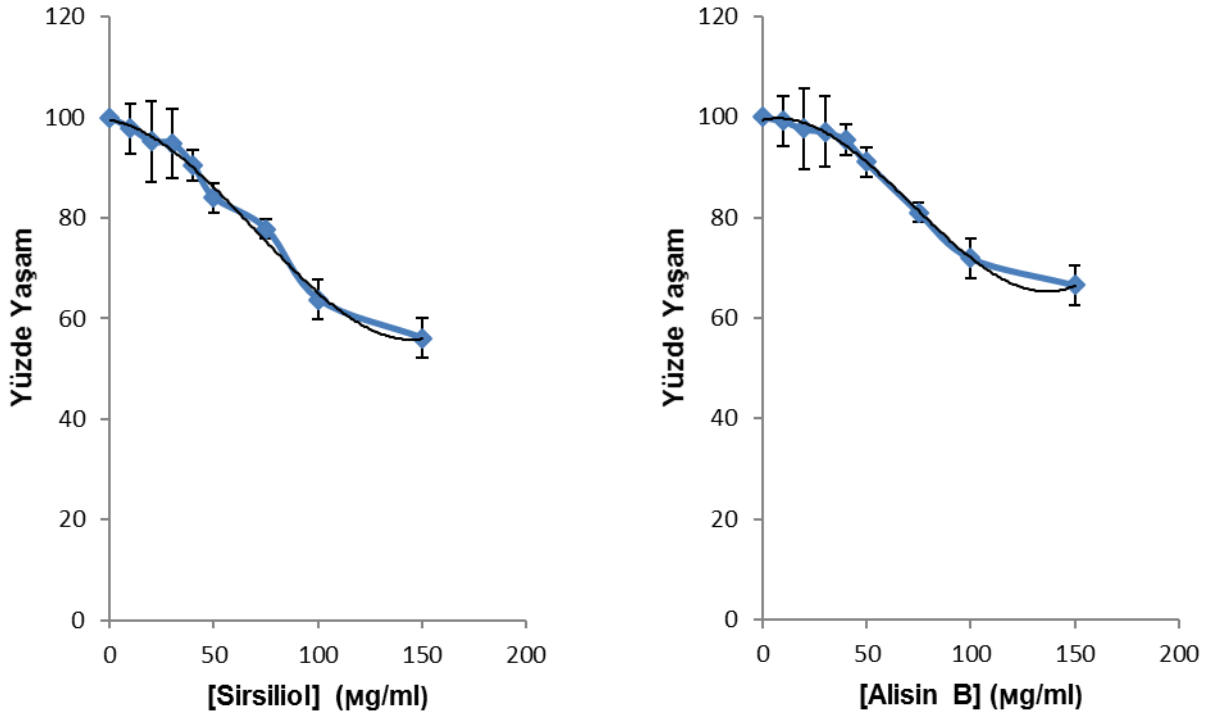
Şekil 6. C2C12 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.



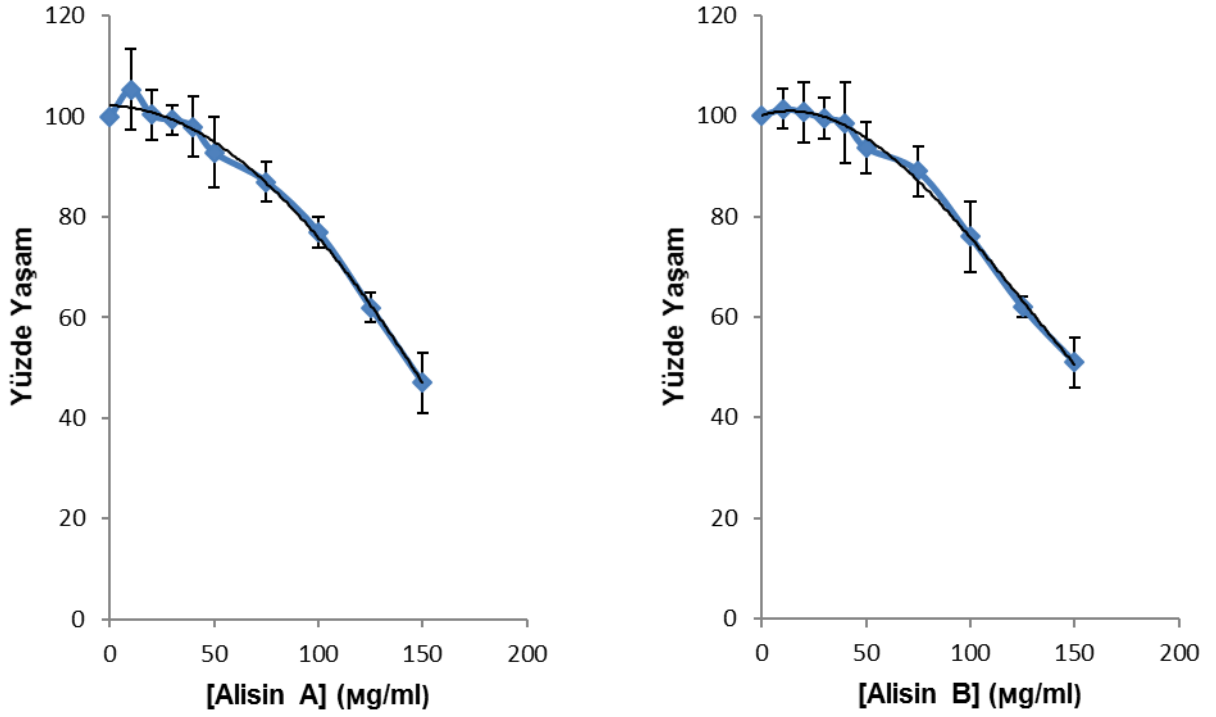
Şekil 7. C2C12 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilineol'ün hücre canlılığına etkisi.



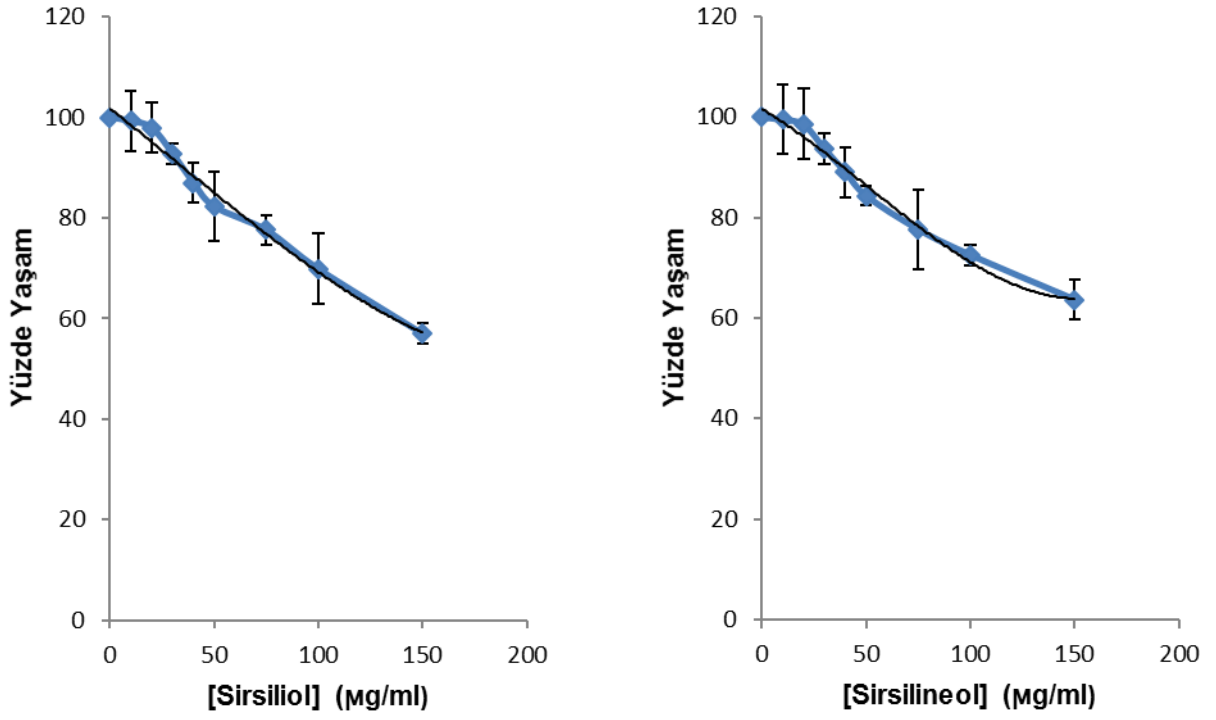
Şekil 8. 3T3 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.



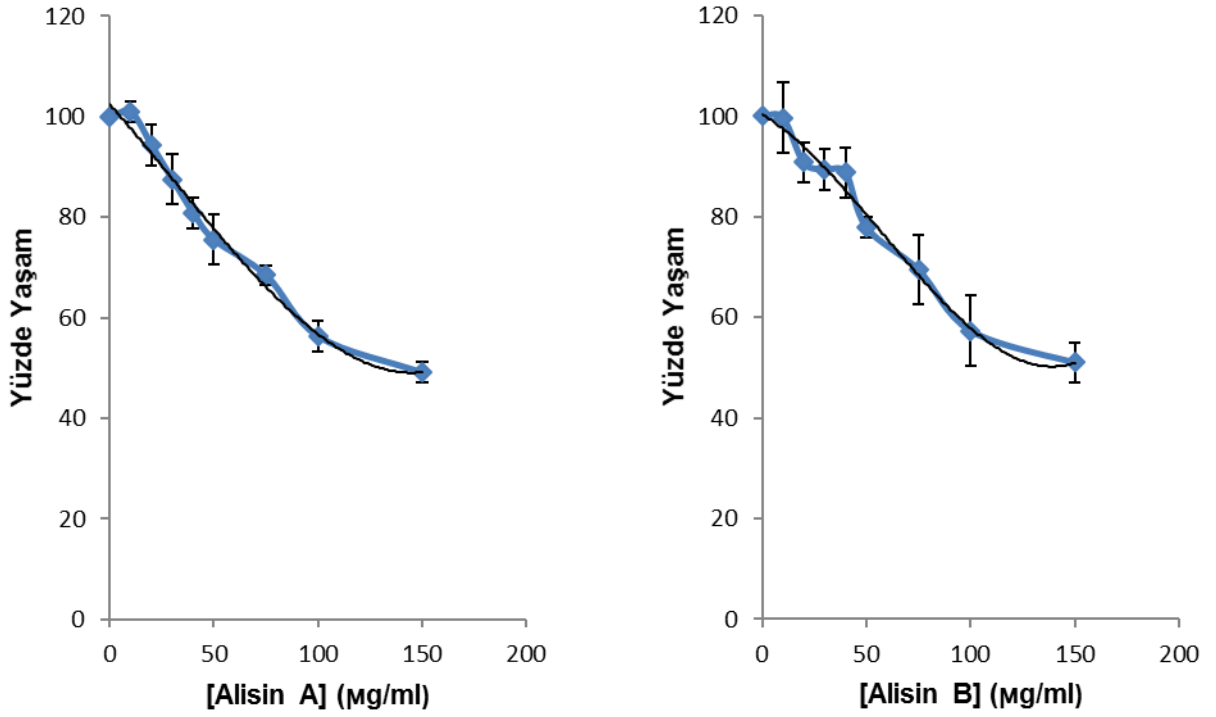
Şekil 9. 3T3 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilincol'ün hücre canlılığına etkisi.



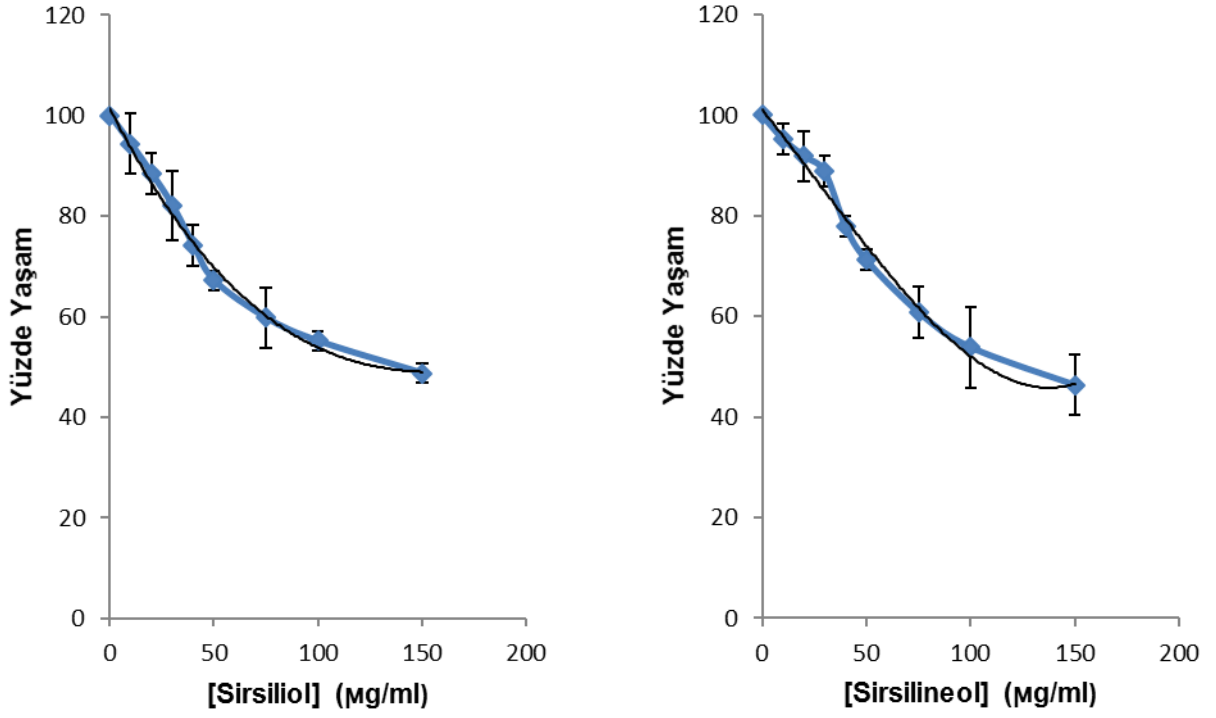
Şekil 10. Chang karaciğer hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.



Şekil 11. Chang karaciğer hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilineol'ün hücre canlılığına etkisi.



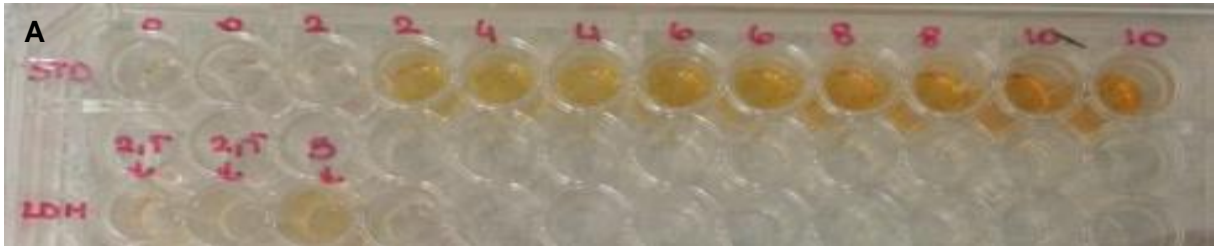
Şekil 12. Caco-2 hücre hattı için Alisin A ve Alisin B'nin hücre canlılığına etkisi.

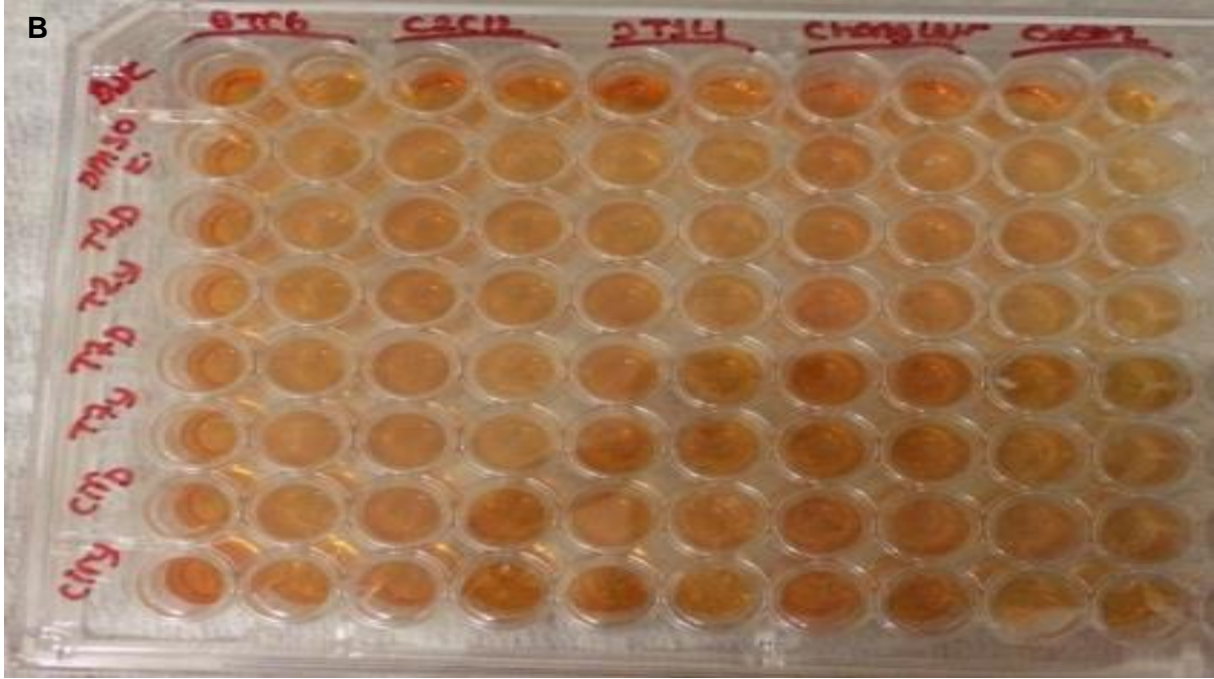


Şekil 13. Caco-2 hücre hattı için Sirsiliol ve Sirsilineol'ün hücre canlılığına etkisi.

3.1.1. Laktat Dehidrojenaz Aktivite Tayini

Üreticinin doğrultusunda gerçekleştirilen ölçümler sonunda elde edilen örnek bir plaka görüntüsü aşağıda Şekil 14'te verilmektedir.





Şekil 14. A) Örnek laktat dehidrogenaz aktivite ölçüm test sonuçları görüntüsü - Artan konsantrasyonlarda standartlar ve LDH pozitif kontrol. B) Hücre hatları ile yapılan LDH aktivite testi - kuyucuklarda her hücre hattı için besiyeri kontrol; DMSO kontrol, düşük ve yüksek doz test bileşikleri uygulaması yapıldı.

Yapılan deney sonunda elde edilen absorbans değerlerinin aşağıdaki formülde yerine konulmasıyla ortamdaki LDH aktivitesi tayin edildi.

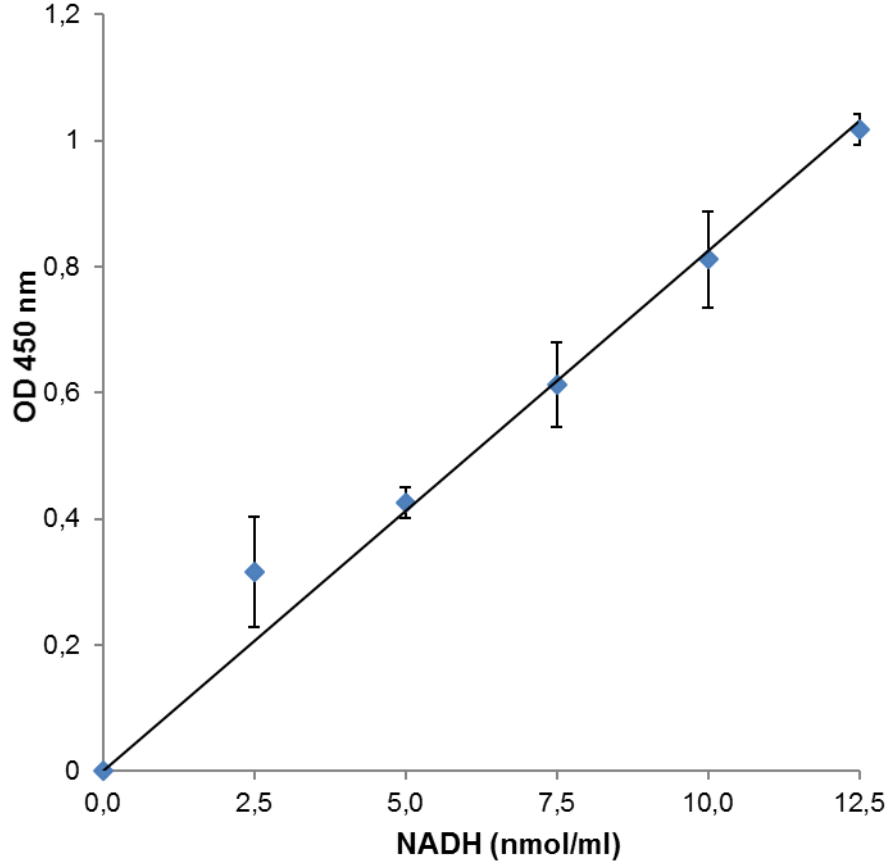
$$\text{LDH Aktivitesi} = \frac{B}{(T2-T1).V} \cdot \text{seyreltme faktörü} = \text{nmol/dk/ml} = \text{mU/ml}$$

B: Farklı iki okuma süresi arasında oluşan NADH miktarı (nmol)

T1: İlk okuma zamanı (A1) (dakika)

T2: İkinci okuma zamanı (A2) (dakika)

V: Reaksiyon ortamına eklenen örnek hacmi (ml)



Şekil 15. Ölçülen veriler doğrultusunda oluşturulan standart NADH eğrisi

Tablo 9. Tüm hücre hatlarında test bileşiklerinin LDH aktiviteleri üzerine etkileri

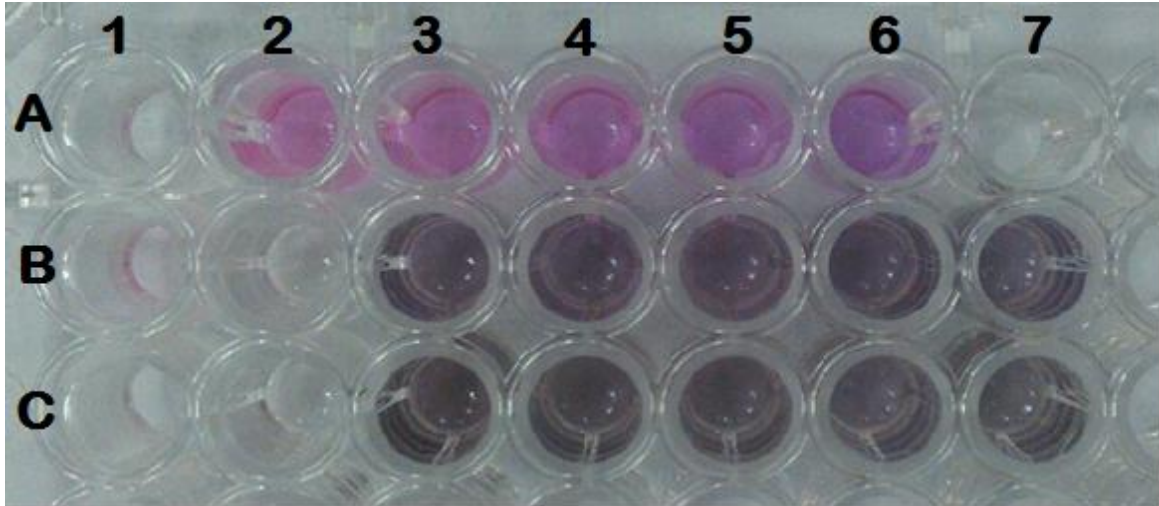
	LDH Aktivitesi (mU/ml)				
	BTC6	C2C12	3T3L1)	Chang Liver	Caco-2
Kontrol	61,2±7,67	52,0±4,3	50,6±6,48	76,3±5,06	41,6±5,43
Alisin A (20)	61,3±199	58,5±5,19	54,5±5,34	74,1±1,46	61,1±5,76
Alisin A (40)	57,4±3,62	54,4±0,72	58,8±3,73	83,5±2,40	47,8±2,67
Alisin B (20)	67,2±1,48	55,9±1,55	53,1±3,72	84,8±2,20	43,6±1,36
Alisin B (40)	66,9±3,68	49,6±2,71	56,1±5,58	64,7±2,19	38,2±3,39
Sirsilol (20)	60,8±1,40	55,1±3,09	52,8±4,89	79,9±2,01	40,1±2,49

Sirsiliol (40)	66,2±3,28	61,2±5,42	55,2±0,88	83,2±1,05	41,8±1,97
Sirsilineol (20)	62,8±5,10	69,8±4,58	61,6±3,24	82,1±6,88	39,0±2,67
Sirsilineol (40)	73,0±5,27	74,2±4,43	61,4±1,51	92,5±8,67	43,9±3,58

Tablo 9’da verilen değerlerin analizleri sonucunda deneylerde kullanılmak üzere saptanan konsantrasyon değerlerinin hücreler tarafından ortama salınan LDH aktivite düzeylerinde herhangi bir anlamlı farklılık oluşturmadığı ve normal besiyeri değerleri ile benzer olduğu tespit edilmişti.

3.2. Glikoz kullanımı Testi

Glikoz alınımı deneyleri 3T3-L1-Adiposit, C2C12 ve Chang hücre hatları ile gerçekleştirildi. Bu deneyler için hücreler 96 kuyulu mikropalakalara kuyucuk başına 4500 hücre olacak şekilde ekildi ve 48 saat boyunca büyütüldü. Bu süre sonunda besiyere 8 mM glikoz +% 0,1 BSA + test bileşik (aşağıda verilmektedir) eklendi ve 2 saatlik ilave bir süre Ortamdaki glikoz miktarı Bölüm 3.4’ teki standart eğri ve formül yardımıyla tayin edildi. Örnek bir glikoz kullanım test plaka görüntüsü aşağıda Şekil 16’da verilmektedir. C2C12, Chang karaciğer ve 3T3-L1 adiposit hücrelerinin test ve pozitif bileşiklerle iki saatlik inkübasyon sonucunda bulunduğu ortamlardaki hesaplanan glikoz konsantrasyonları da Tablo 10’da verilmektedir.



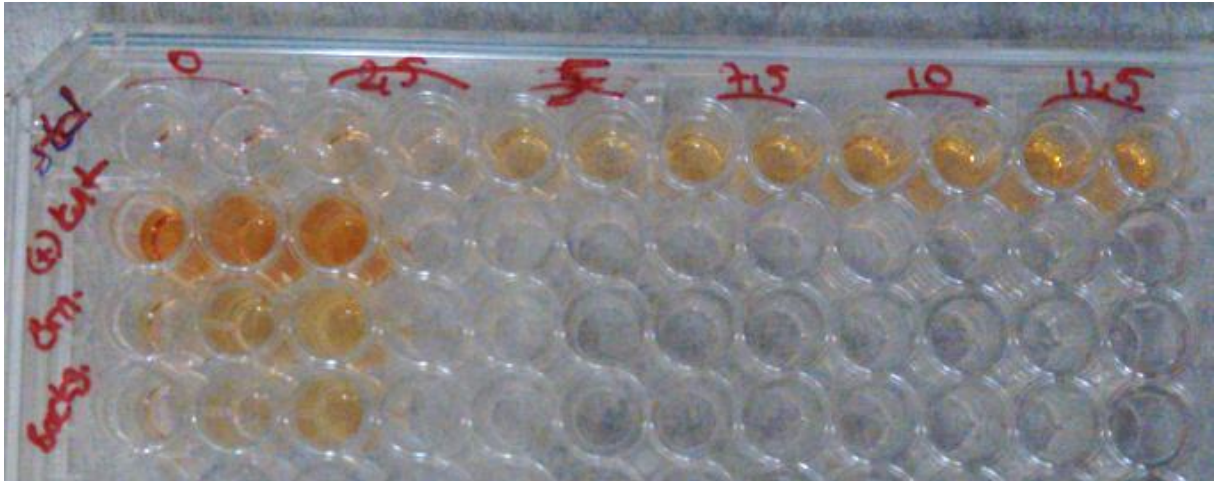
Şekil 16. C2C12 ve Chang liver hücre hatlarıyla yapılan glikoz kullanım testi - A1: standart 1 (0 nmol/kuyucuk); A2: standart 2 (2 nmol/kuyucuk); A3: standart 3 (4 nmol/kuyucuk); A4: standart 4 (6 nmol/kuyucuk); A5: standart 5 (8 nmol/kuyucuk); A6: standart 6 (10 nmol/kuyucuk); B1-C1: Besiyer kontrol; B2-C2: DMSO kontrol; B3-C3: Metformin; B4-C4: İnsülin; B5-C5: Alisin A; B6-C6: Alisin B; B7-C7: Sirsilineol.

Tablo 10. C2C12, Chang karaciğer ve 3T3-L1 adiposit hücrelerinin test ve pozitif bileşiklerle iki saatlik inkübasyon sonucunda bulunduğu ortamlardaki glikoz konsantrasyonları

	Glikoz Konsantrasyonu (µg/ml)		
	C2C12	Chang karaciğer	3T3L1-Adiposit
Metformin	1,84±0,06	2,05±0,19	10,3±0,98
İnsulin	2,25±0,10	2,27±0,07	9,83±0,62
Alisin A	2,02±0,19	2,48±0,13	9,78±0,32
Alisin B	2,36±0,20	2,39±0,18	9,54±0,72
Sirsilliol	1,86±0,11	1,98±0,17	2,11±0,21
Sirsilineol	2,10±0,12	2,05±0,04	2,45±0,24

3.2.1. Gliserol-3-Fosfat Dehidrogenaz Aktivite Tayini

3T3L1 pre-adiposit hücrelerinin adiposit hücrelerine dönüşümünü kontrol etmek amacıyla gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (G3PDH) aktivitesi ölçüldü çünkü farklılaşmasının bir göstergesi olarak G3PDH kullanılmaktadır. Bunun için Bölüm 2.5.1’de belirtilen metot ile G3PDH aktivite tayini gerçekleştirildi. Elde edilen örnek ölçüm plaka görüntüsü Şekil 17’de sunulmaktadır.



Şekil 17. Dönüştürülmüş 3T3L1 hücre ile yapılan temsili gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivite test plakası resmi. Birinci sıra kuyucuklarda şekil üzerinde yazılan konsantrasyonda standartlar bulunmaktadır. İkinci sıra ilk 3 kuyucukta dönüştürülen hücreler, üçüncü sıra ilk 3 kuyucukta dönüştürülmeyen hücreler ve son sıra ilk 3 kuyucukta artalan yer almaktadır..

Standart eğri baz alınarak deney sonunda elde edilen absorpsiyon değerlerinin aşağıdaki formülde yerine konulmasıyla hücrelerin farklılaşma derecesi gliserol-3-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesiyle tayin edildi. Sonuçlar Tablo 11’de verilmektedir.

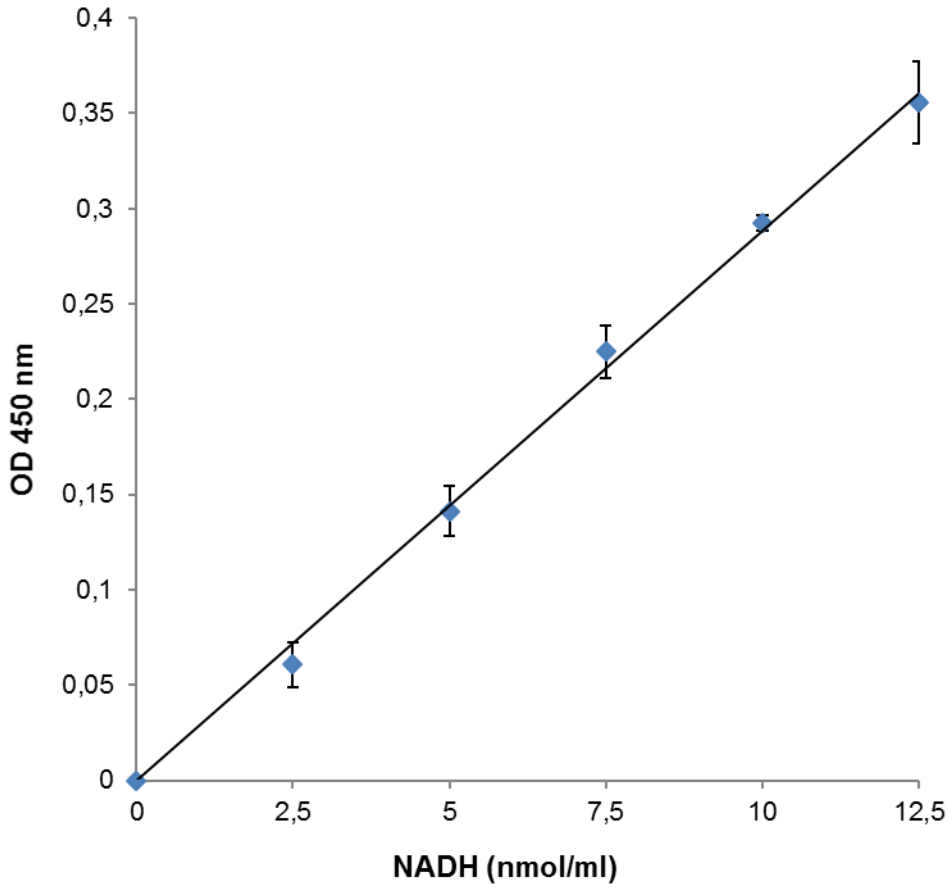
Örnekteki gliserol-3-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi = $B / (\Delta T \cdot V) \cdot D = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$

B: Standart eğriden elde edilen NADH miktarı (nmol)

ΔT : Reaksiyon zamanı (dk)

V: Reaksiyon ortamına eklenen örnek hacmi (ml)

D: Örneğin seyreltme faktörü



Şekil 18. Elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan NADH standart eğrisi

Tablo 11. Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesine ait değerler

Örnek Hacmi (ml)	G3PDH aktivitesi (mU/ml)
3T3-L1 Pre-adiposit	6,94 ± 1,14

3.3. Glikoz Depolama Testi

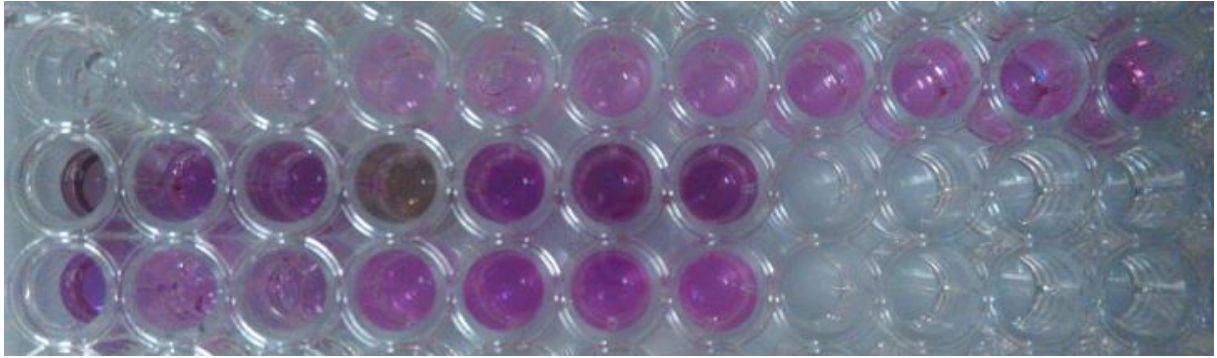
Üreticinin direktifleri doğrultusunda yapılan deney sonunda elde edilen absorbans değerlerinin aşağıdaki formülde yerine konulmasıyla test bileşiklerinin varlığında ortamdaki glikojen miktarı tayin edildi (Şekil 19 ve Tablo 12)

Örnekteki Glikojen Konsantrasyonu (C) : $B / V \times D$ mg/ml

B: Örneğin standart eğriden elde edilen glikojen miktarı (mg)

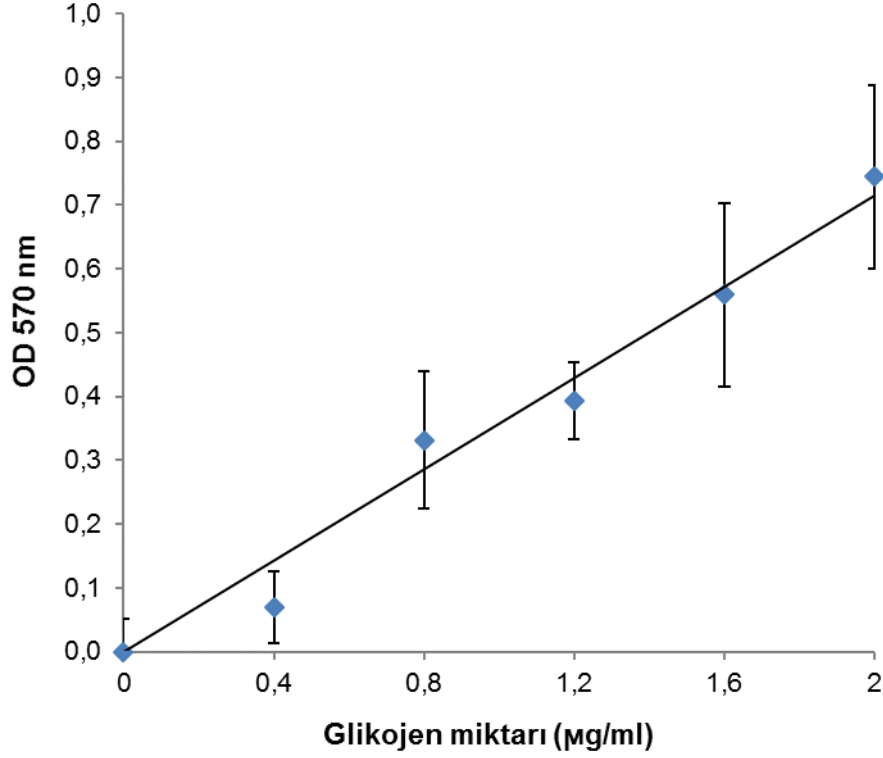
V: Reaksiyon ortamına eklenen örnek hacmi (ml)

D: Örneğin seyreltme faktörü



Şekil 19. Temsili glikojen ölçüm plaka görüntüsü. İlk sırada artan konsantrasyonlarda glikojen standartları; diğer iki sıra ise yukarıdan aşağıya C2C12 ve Chang karaciğer hücre hatlarının test bileşikler uygulanması sonrası örnekleri yer almaktadır.

Bölüm 2.6 da anlatıldığı şekilde kuyularda oluşturulan bilinen miktarlarda eklenen standard glikojen ile elde edilen veriler aşağıdaki Şekil 20'de verilmektedir.



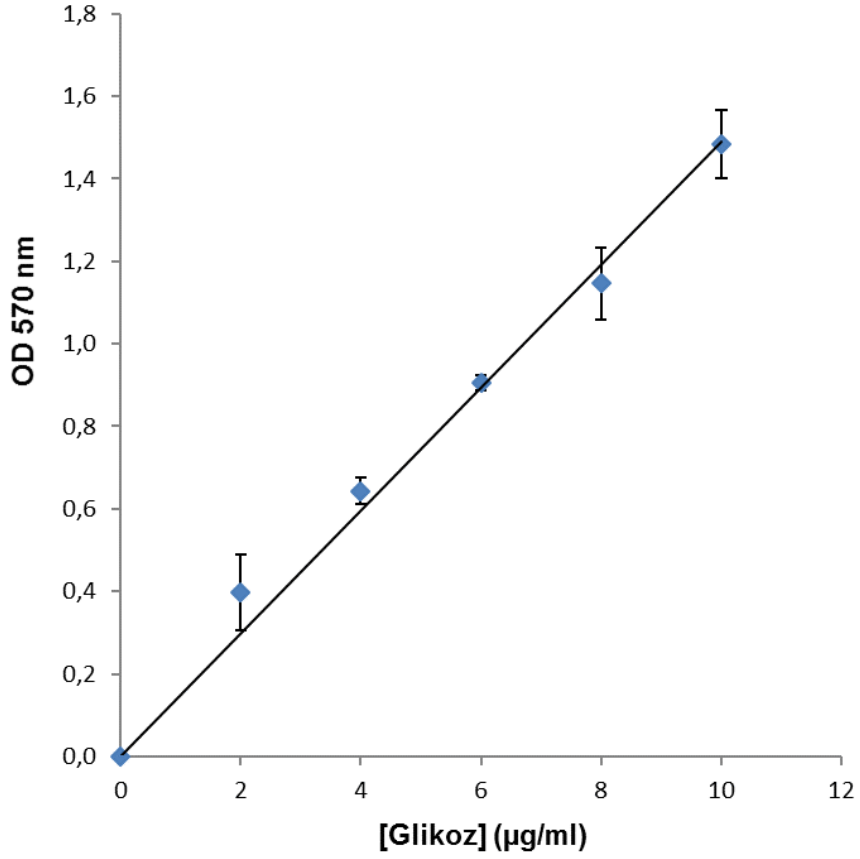
Şekil 20. Oluşturulan standart glikojen eğrisi

Tablo 12. C2C12 ve Chang karaciğer hücre hatlarında pozitif kontrol ve test bileşiklerinin etkisiyle depolanan glikojen miktarları. Sonuçlar besiyer ve çözücü değerleri çıkartılarak elde edildi.

Ortam	Glikojen Konsantrasyonu (µg/ml)	
	C2C12	Chang karaciğer
İnsülin	0,534 ± 0,021	0,305 ± 0,018
Alisin A	0,597 ± 0,080	0,432 ± 0,087
Alisin B	0,717 ± 0,071	0,591 ± 0,051
Sirsineol	0,401 ± 0,041	0,428 ± 0,088
Sirsilineol	0,451 ± 0,053	0,549 ± 0,091

3.4. Glikoz Taşınımı Testi

Üreticinin direktifleri doğrultusunda yapılan deney sonunda elde edilen absorbans değerlerinin aynen Bölüm 3.2'de verilen formülde yerine konulmasıyla ortamdaki glikoz miktarları tayin edildi. Standart kuyucuklarına eklenen bilinen miktarlardaki standart glikoz ile elde edilen standart eğri aşağıdaki Şekil 21'de verilmektedir.



Şekil 21. Oluşturulan standart glikoz eğrisi.

Tablo 13. Pozitif kontrol ve test bileşiklerin “transwell” içerisindeki oluşturulan Caco-2 hücre hattı katmanı üzerinden glikoz taşınımına olan etkilerinin zamansal değerleri - apikal ve bazolateral yüzeylerdeki glikoz konsantrasyonları.

Ortam	Glikoz Konsantrasyonu (µg/ml)			Glikoz Konsantrasyonu (µg/ml)		
	Apikal yüzey			Bazolateral yüzey		
	0.dk	30.dk	60.	0.	30.	60.
İnsülin	1,63±0,10	1,61±0,03	1,61±0,06	0,088±0,00	4,55±0,37	6,79±0,42
Alisin A	1,70±0,16	1,88±0,021	1,65±0,06	0,30±0,001	3,80±0,32	7,29±0,51
Alisin B	1,73±0,03	1,58±0,09	1,69±0,10	0,11±0,01	3,53±0,24	14,06±0,91
Sirsiliol	1,58±0,08	1,62±0,09	1,68±0,01	0,11±0,00	3,52±0,20	6,02±0,42
Sirsilineol	1,38±0,06	1,40±0,08	1,31±0,10	0,20±0,01	4,15±0,21	6,35±0,35

3.5. Glikoz Emilimi Testi

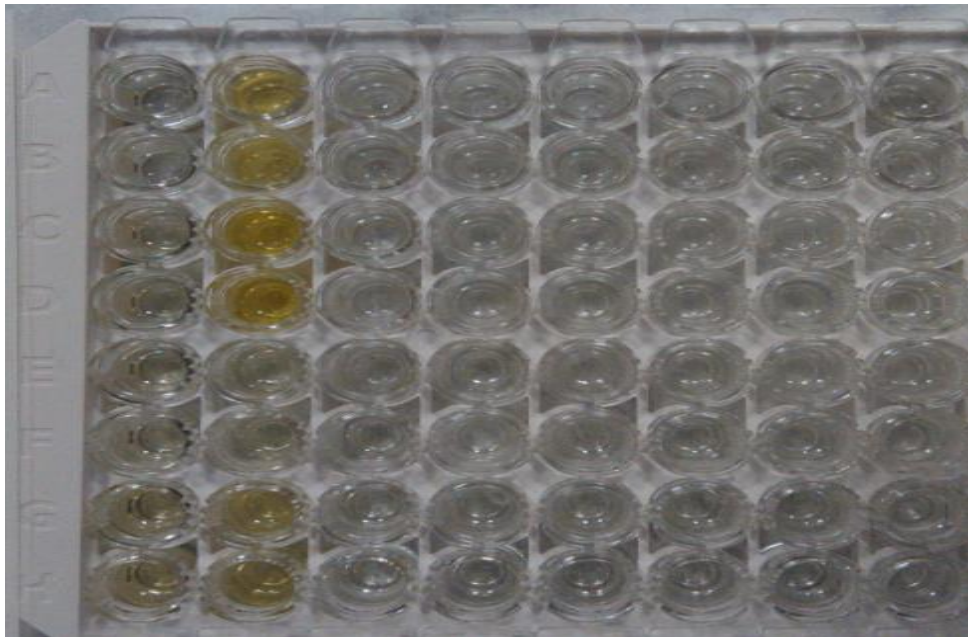
Glikoz emilim testleri aynen glikoz taşımımında olduğu gibi Caco-2 hücre hattı ile gerçekleştirilirdi. Bu tayin aynı temeli taşıdığı ve glikoz tayini yapılarak gerçekleştirildiği için yukarıda Bölüm 3.4'te verilen standart eğri kullanıldı ve aynı formül kullanıldı.

Tablo 14. Caco-2 hücrelerinin farklı test bileşikleri ile birlikte bulunduğu ortamların apikal yüzeyinde alfa-glikosidaz tarafından salınan glikoz konsantrasyonları. Pozitif kontrol olarak glibenklamid kullanılmıştır.

Ortam	Glikoz Konsantrasyonu (µg/ml)
Kontrol	0,080 ± 0,00
Alisin A	0,088 ± 0,12
Alisin B	0,094 ± 0,17
Sirsiliol	0,091 ± 0,00
Sirsilineol	0,094 ± 0,00

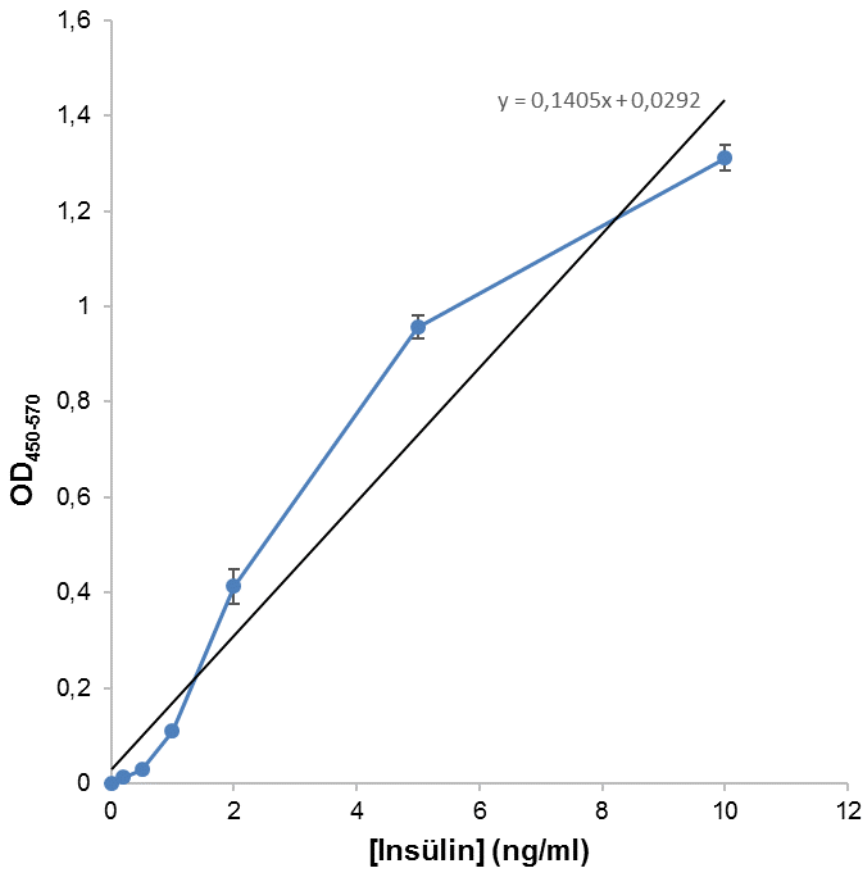
3.6. İnsülin Salınımı Testi

İnsülin salınım testi, bu fizyolojik fonksiyona sahip olan BTC6 hücreleri ile Bölüm 2.5'te detaylı anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Taze pasajlanmış BTC6 hücreleri test bileşikleri ile inkübe edilerek ortama salınan insülin miktarı Millipore İnsülin ELISA kiti ile tayin edildi. Elde edilen plaka görüntüsü aşağıdaki Şekil 22'de verilmektedir.



Şekil 22. BTC6 hücre hattında Millipore İnsülin ELISA kiti ile elde edilen örnek plaka görüntüsü. Kuyucuklar şu şekildedir: A1-B1: standart 1 (0,2 ng/ml); C1-D1: standart 2 (0,5 ng/ml); E1-F1: standart 3 (1ng/ml); G1-H1: standart 4 (2 ng/ml); A2-B2: standart 5 (5 ng/ml); C2-D2: standart 6 (10 ng/ml); E2-F2: kalite kontrol1; G2-H2: kalite kontrol 2; A3-D3: Krebs-ringer-bikarbonat-hepes tamponu; E3-H3: %10 DMSO kontrol; A4-D4: %20 DMSO kontrol; E4-H4: Glibenklamid; A5-D5: circilineol 20 µg/ml; E5-H5: circilineol 40 µg/ml; A6-D6: TAL2 20 µg/ml; E6-H6: TAL2 40 µg/ml; A7-D7: TAL7 20 µg/ml; E7-H7: TAL7 40 µg/ml; A8-D8: Kör

Elde edilen standart değerler oluşturularak çizilen standart insülin grafiği de Şekl 23'te verilmektedir.

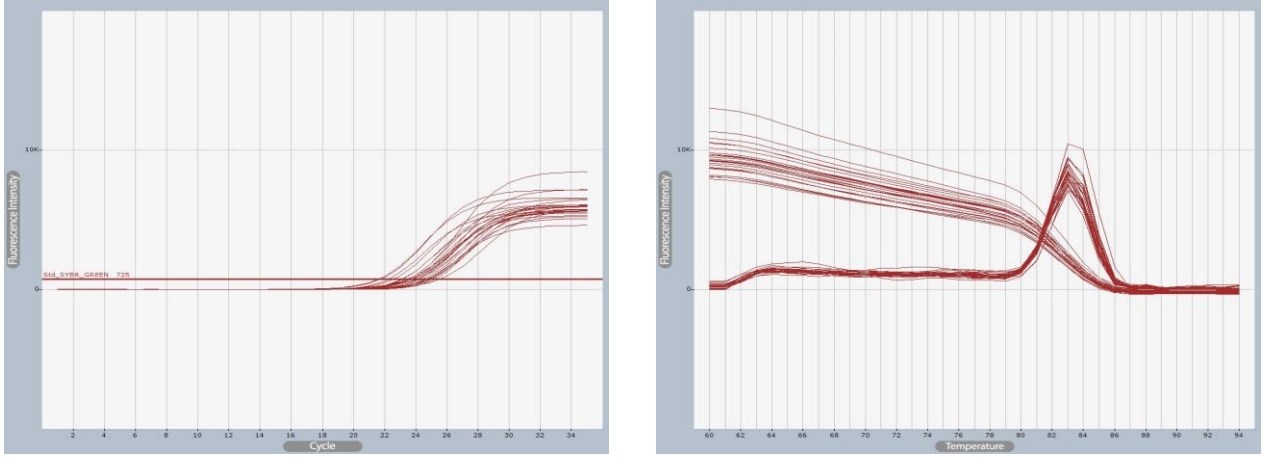


Şekil 23. Oluşturulan standart glikoz eğrisi.

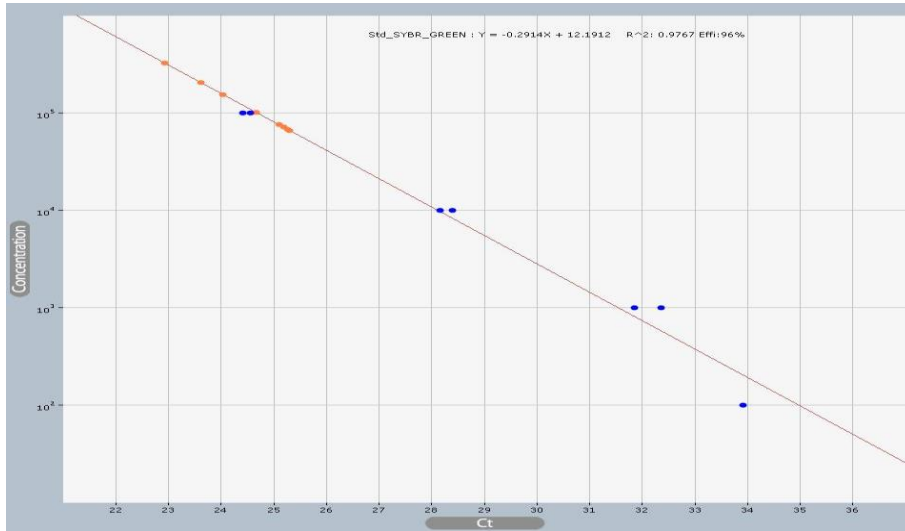
Şekil 22'de görüldüğü gibi test bileşiklerinin hiç birisi insülin salınımını tetiklememiştir ve elde edilen değerler kör değerleri ile eşdeğerdir.

3.7. İnsülin Sinyal Yolağı Gen İfade Analizleri

İnsülin yolağının çeşitli basamaklarında yer alan genlerin ifade düzeyleri ilgili genin ekspres edildiği hücre hatları kullanılarak mRNA düzeyinde ki ifadeleri gerçek zamanlı PZR ile tayin edildi. Bu işlem için öncelikle çalışılacak her bir gen için amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı. Daha sonra bu değerler kullanılarak her bir gen için mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, Alisin A, Alisin B, Sirsilol ve Sirsilinol uygulanan örneklerde saptandı (Şekil 24-25).

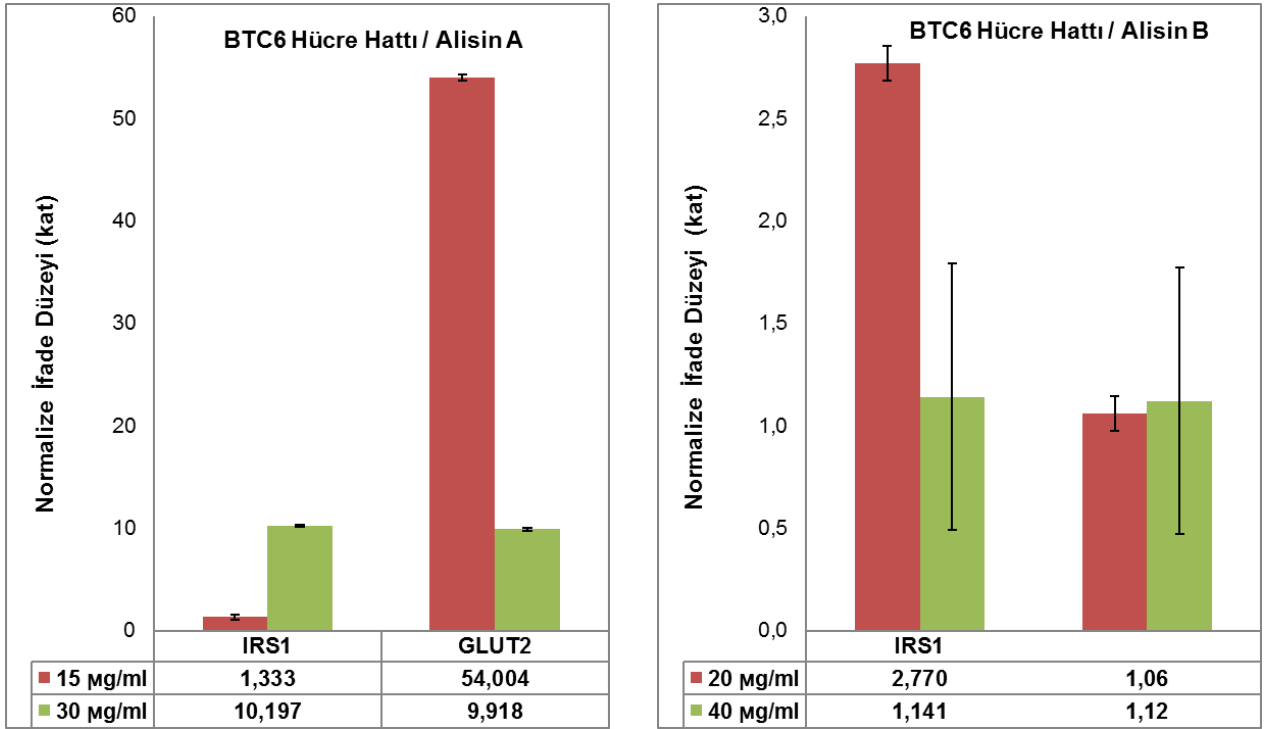


Şekil 24. Örnek olarak Chang karaciğer hücre hattında IRS geninin optimizasyon çalışmaları:
A) Amplifikasyon eğrisi B) Erime eğrisi analizi

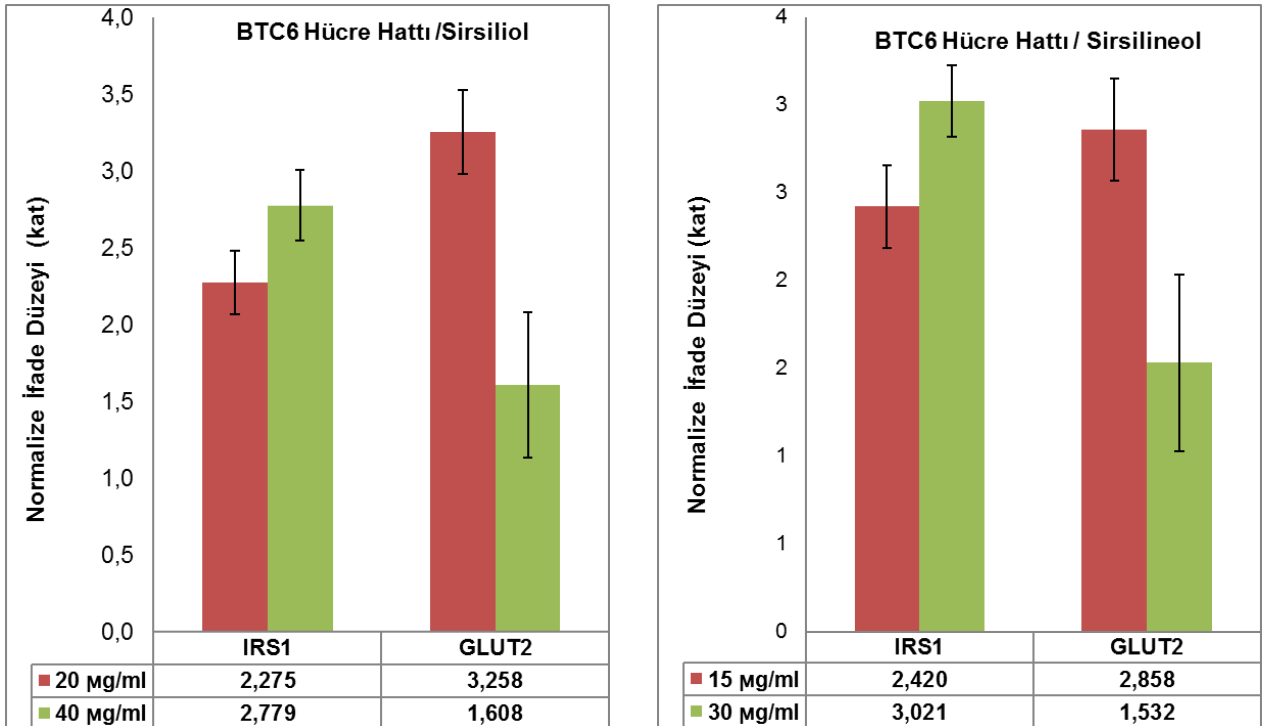


Şekil 25. Örnek standard kalibrasyon eğrisi

3.7.1. Test Bileşiklerinin BTC6 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

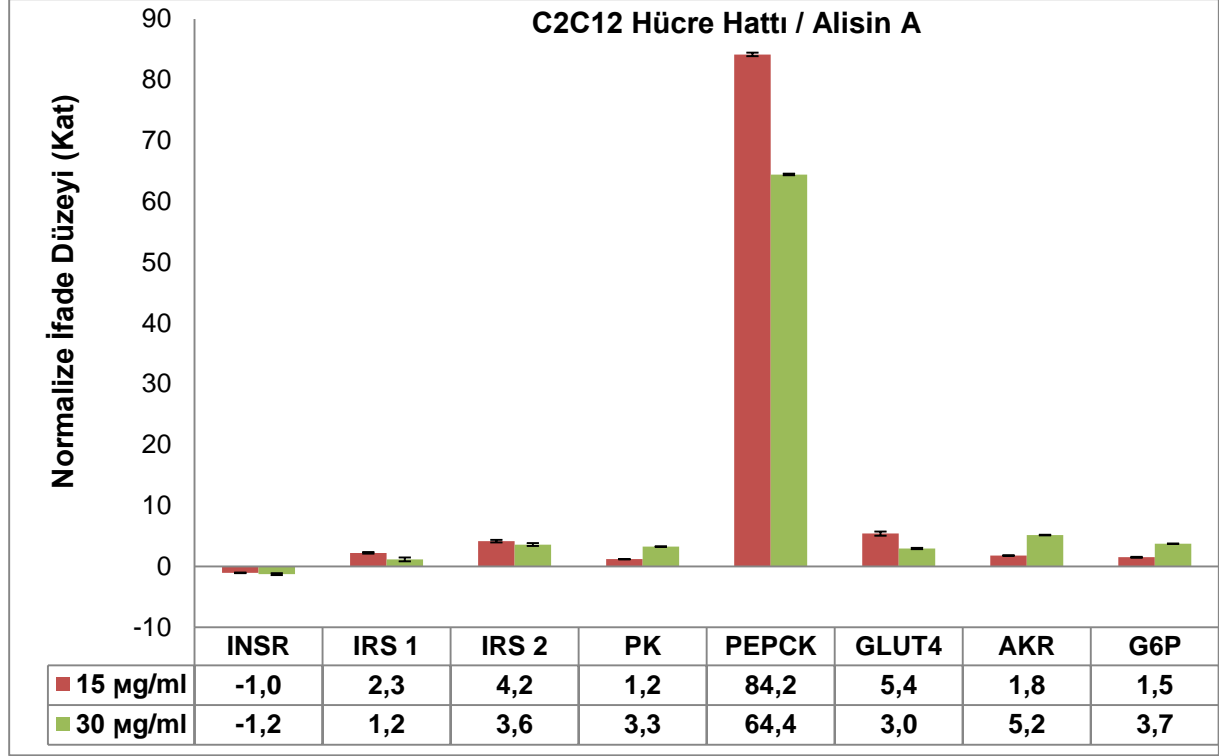


Şekil 26. Alisin A ve B test bileşiklerinin pankreatik B hücre hattında (BTC6) diyabet ilişkili IRS1 ve GLUT2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

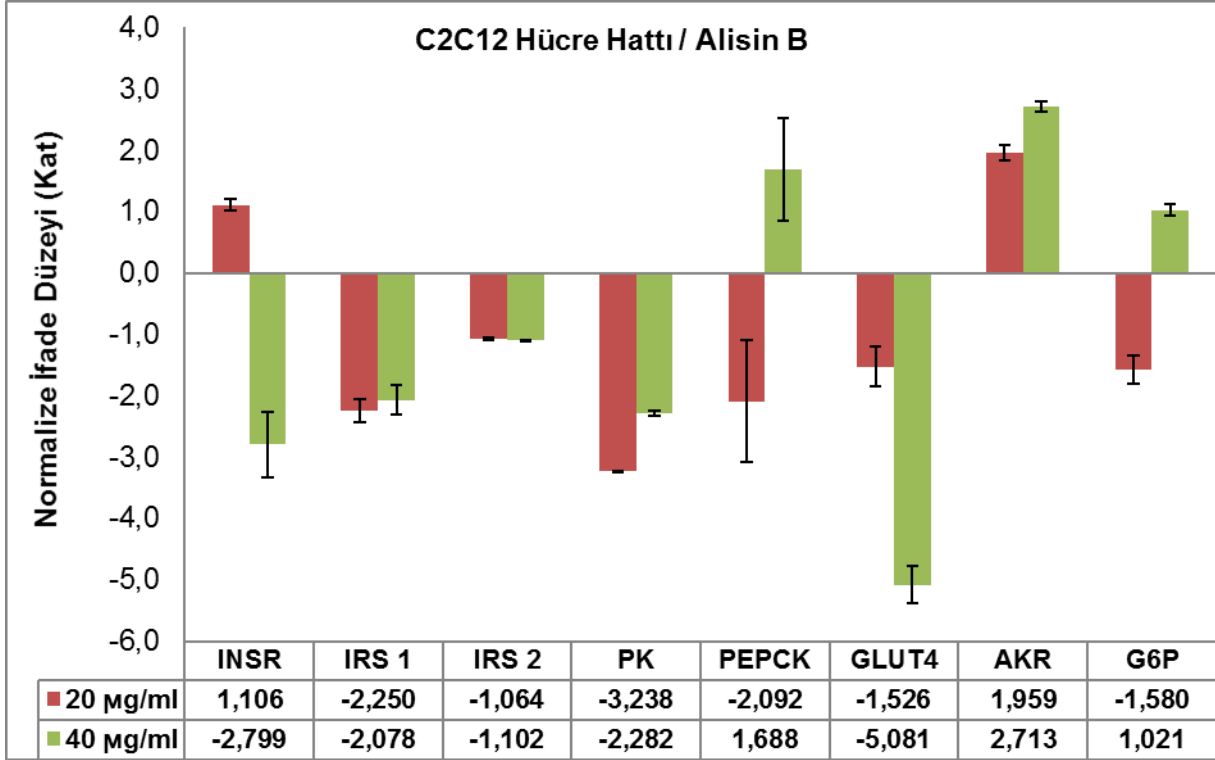


Şekil 27. Sirsiliol ve Sirsilinol test bileşiklerinin pankreatik B hücre hattında (BTC6) diyabet ilişkili IRS1 ve GLUT2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

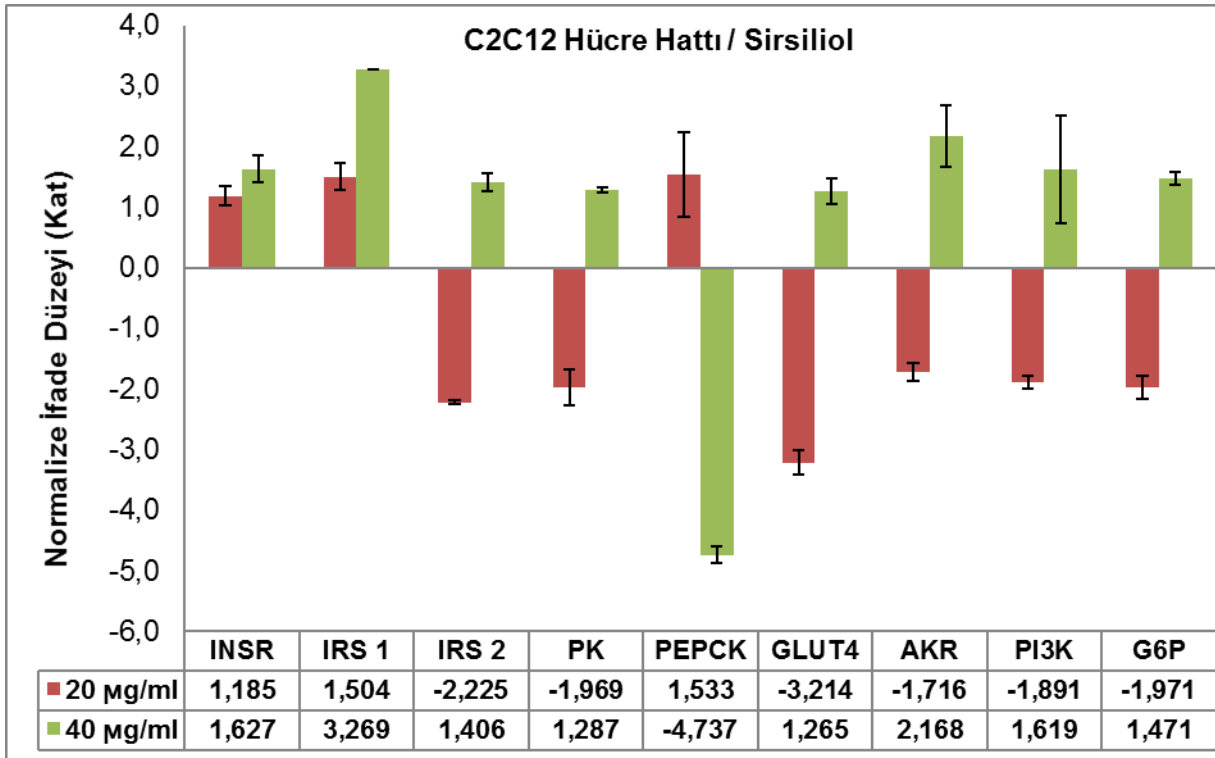
3.7.2. Test Bileşiklerin C2C12 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi



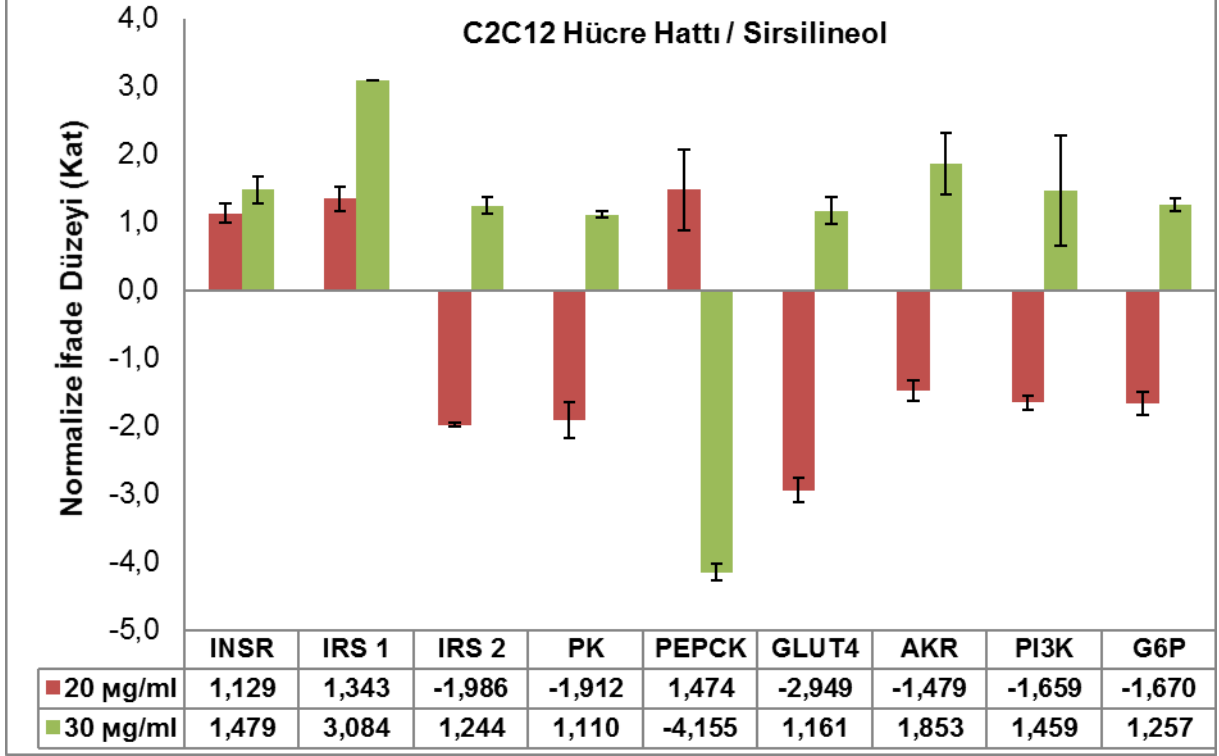
Şekil 28. Alisin A test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.



Şekil 29. Alisin B test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

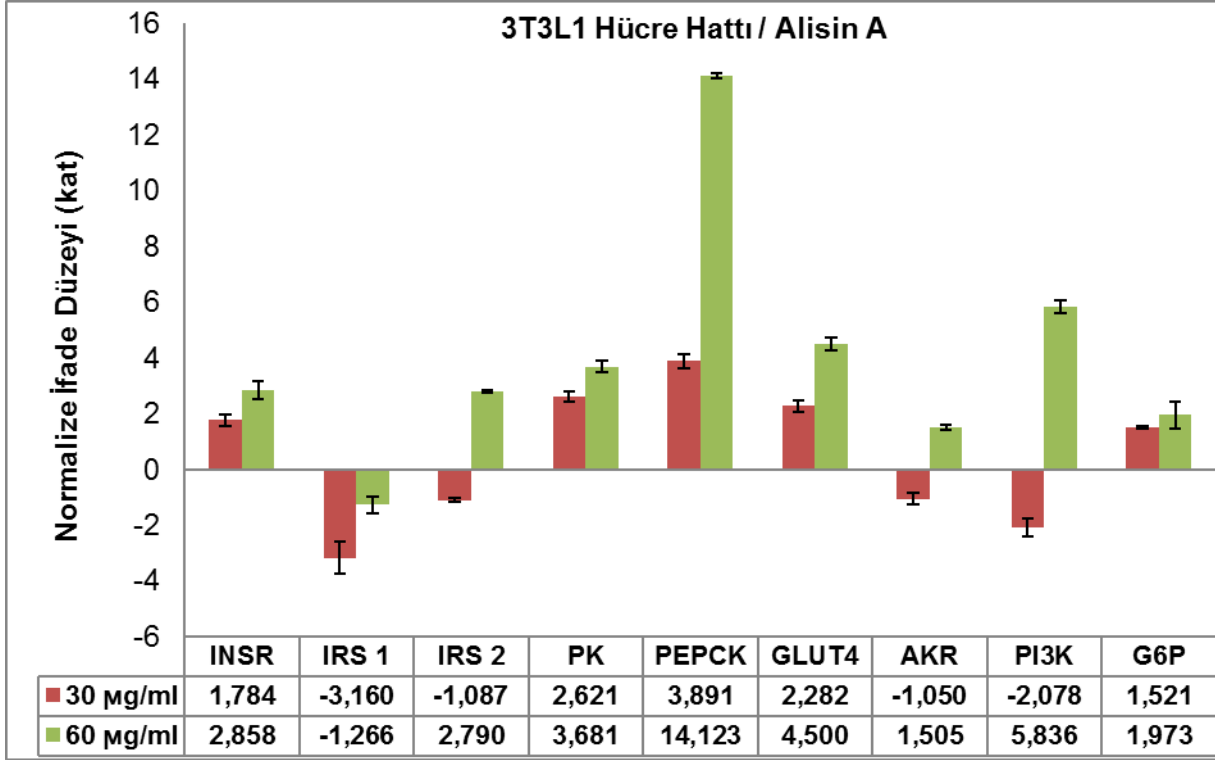


Şekil 30. Sirsiliol test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

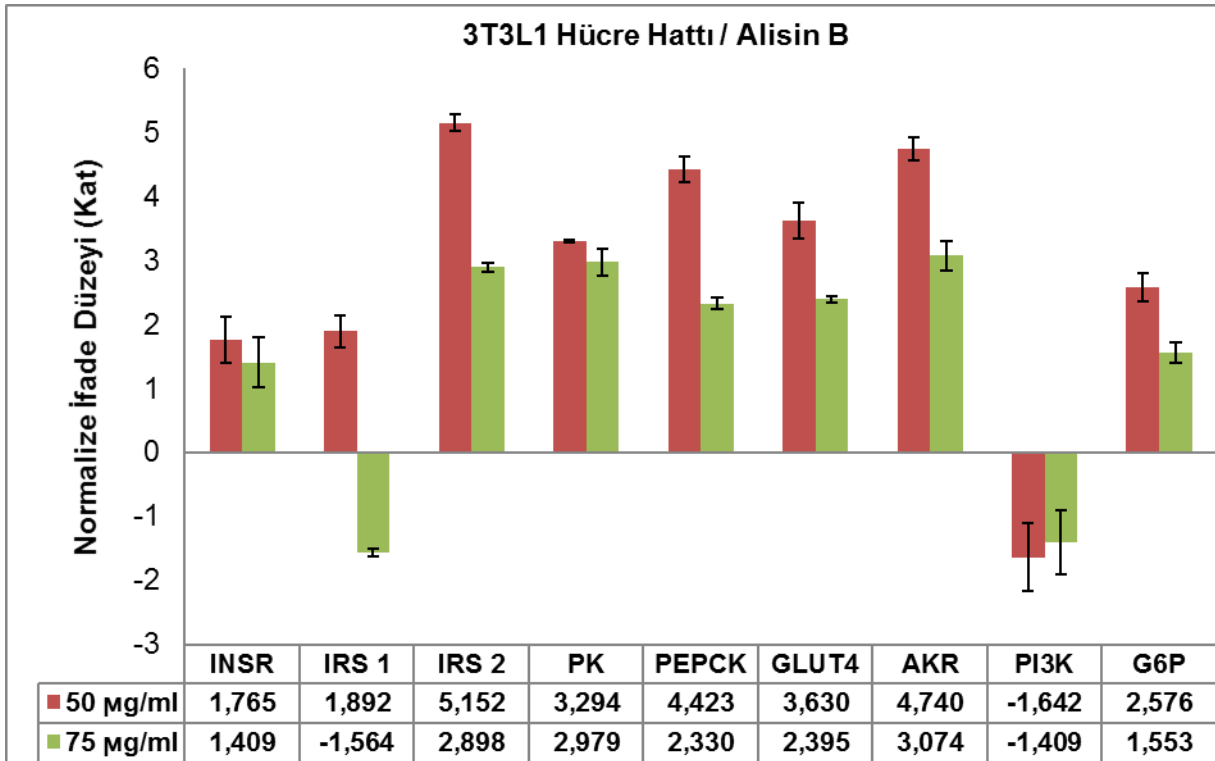


Şekil 31. Sirsilineol test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

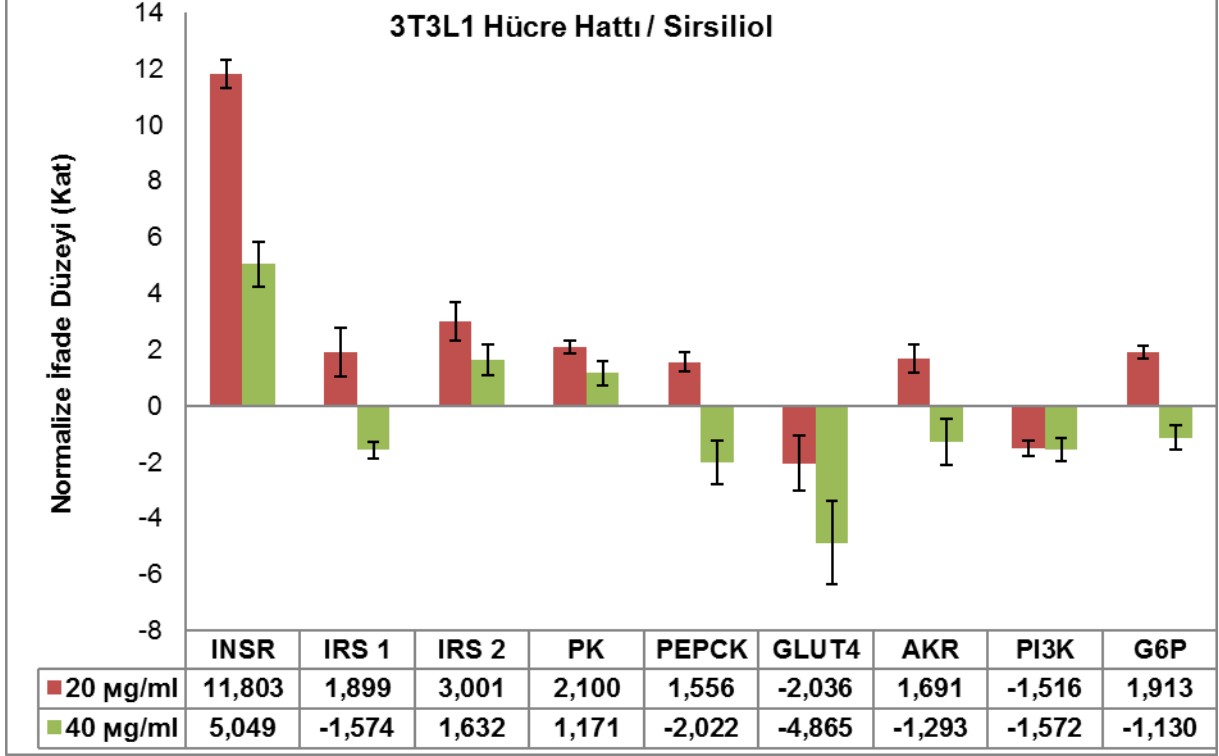
3.7.3. Test Bileşiklerin 3T3-L1 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi



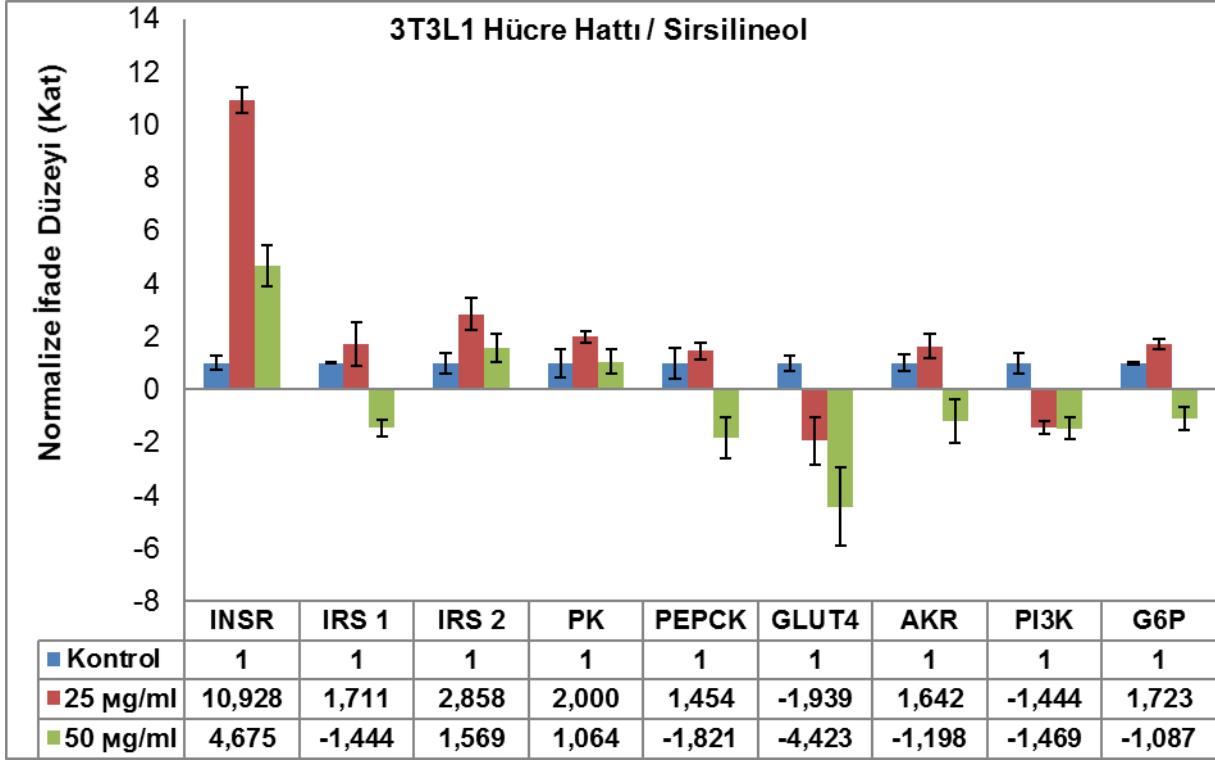
Şekil 32. Alisin A test bileşiminin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.



Şekil 33. Alisin B test bileşiğinin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

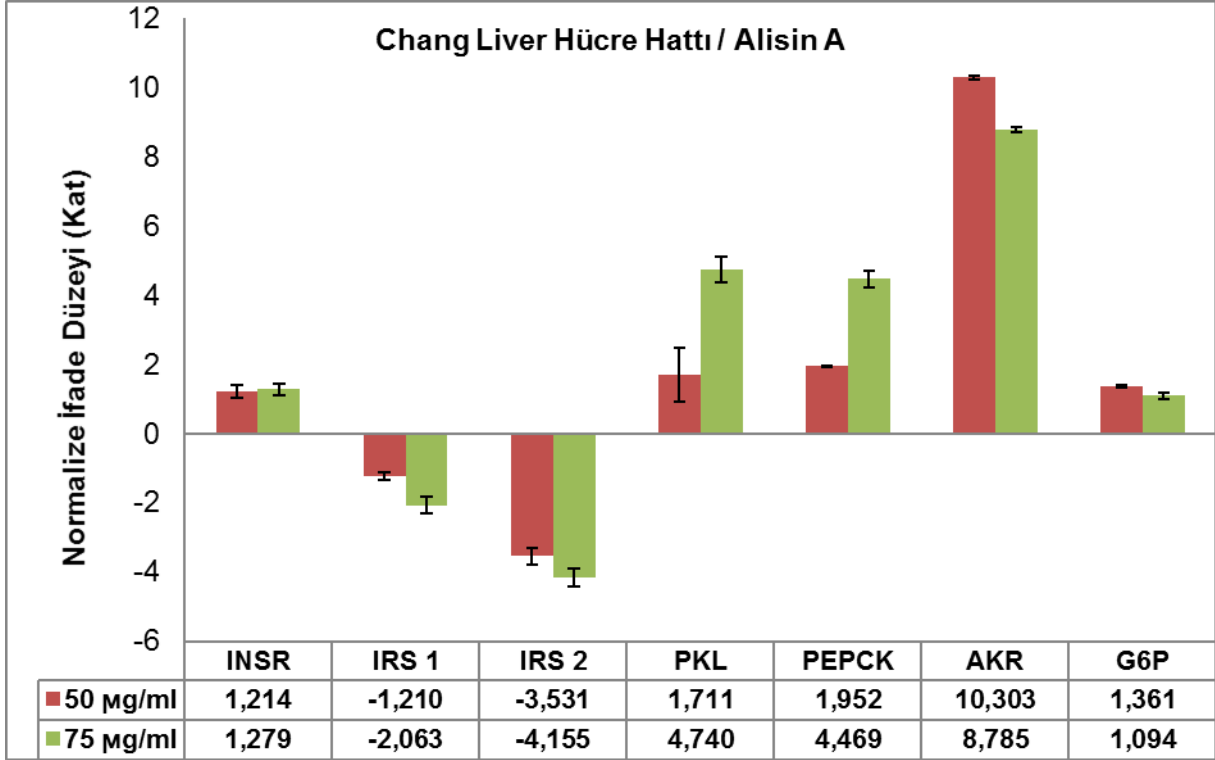


Şekil 34. Sirsiliol test bileşiğinin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

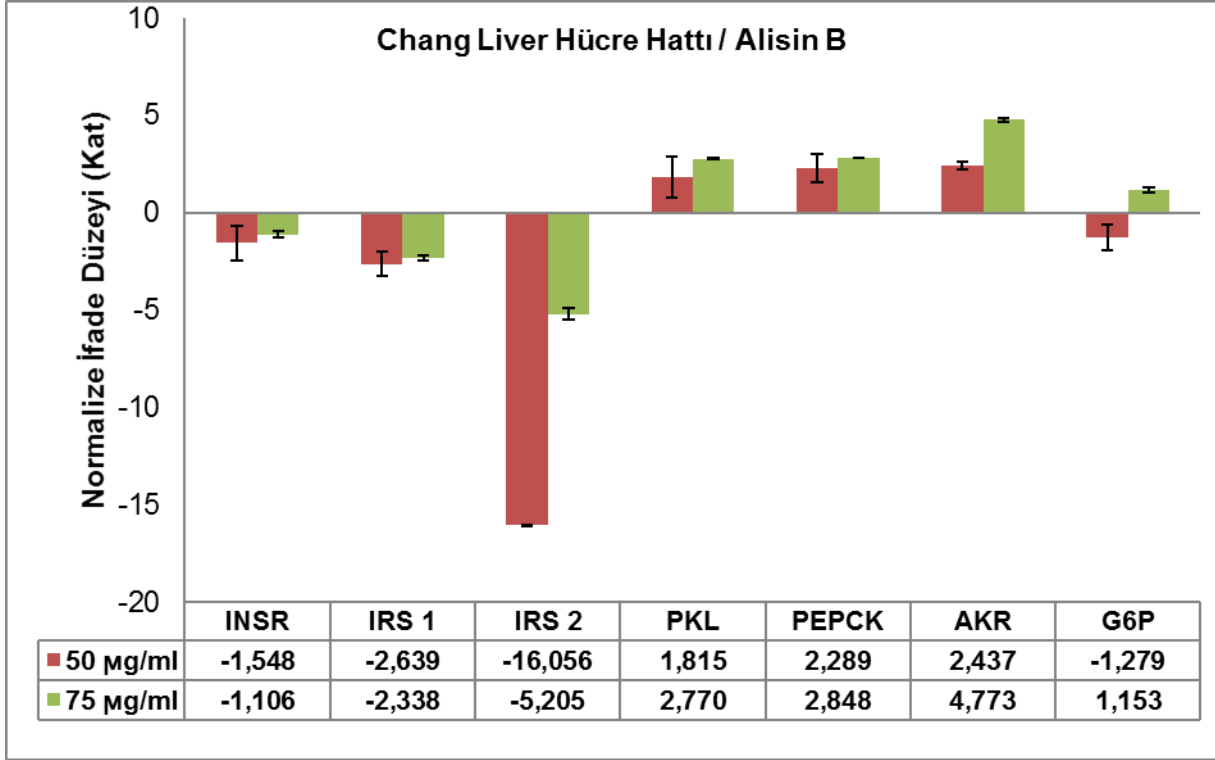


Şekil 35. Sirsilineol test bileşiğinin fare pre-adiposit hücre hattında (3T3L1) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

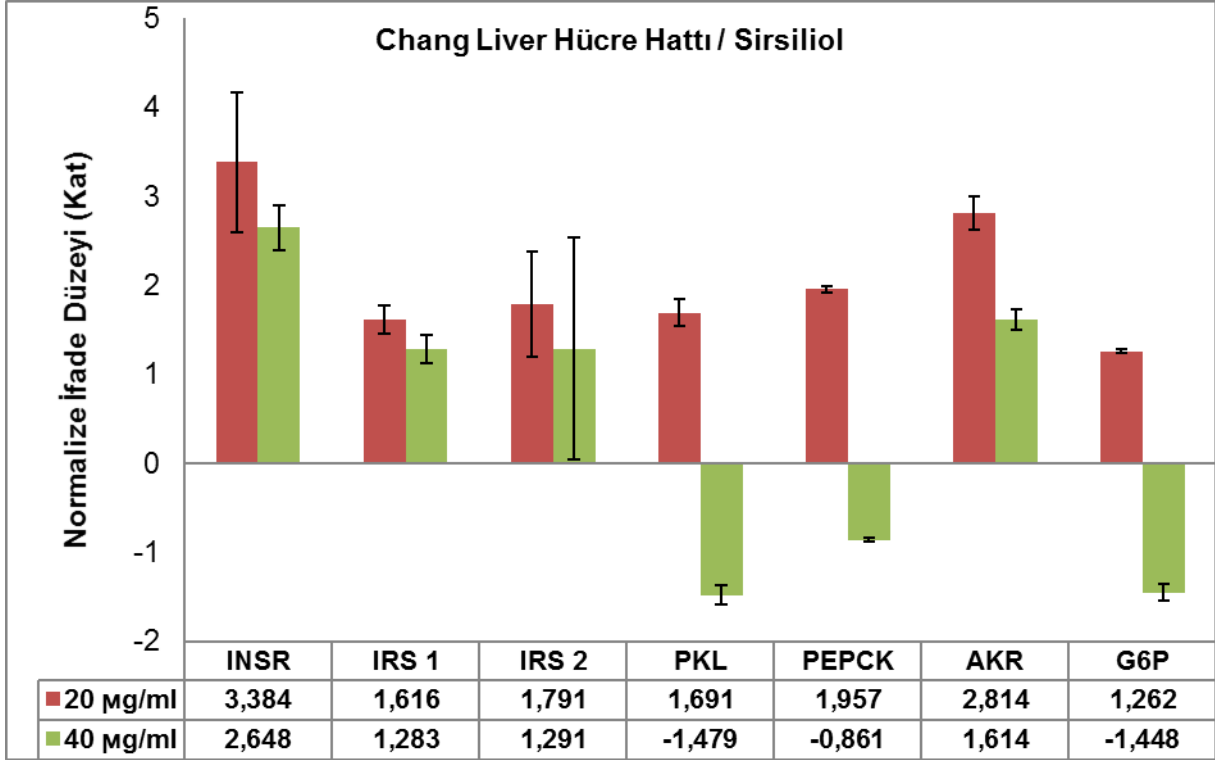
3.7.4. Test Bileşiklerin Chang karaciğer Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi



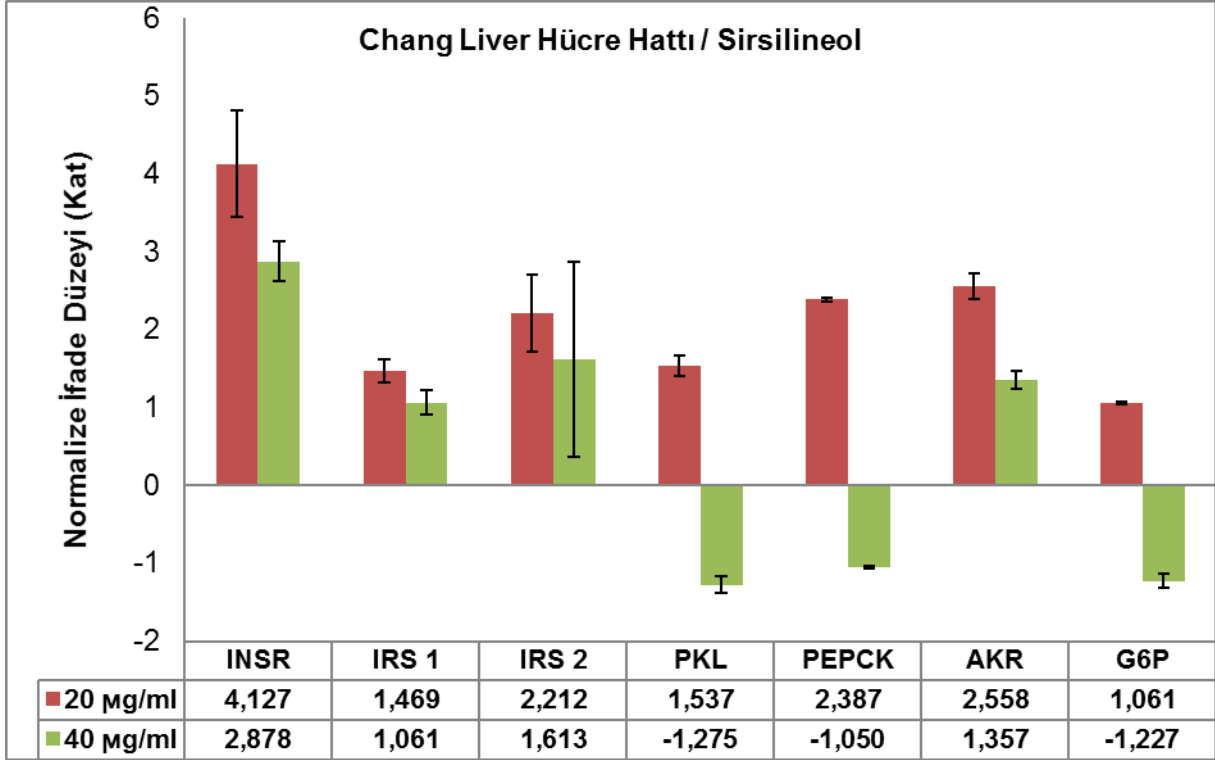
Şekil 36. Alisin A test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.



Şekil 37. Alisin B test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

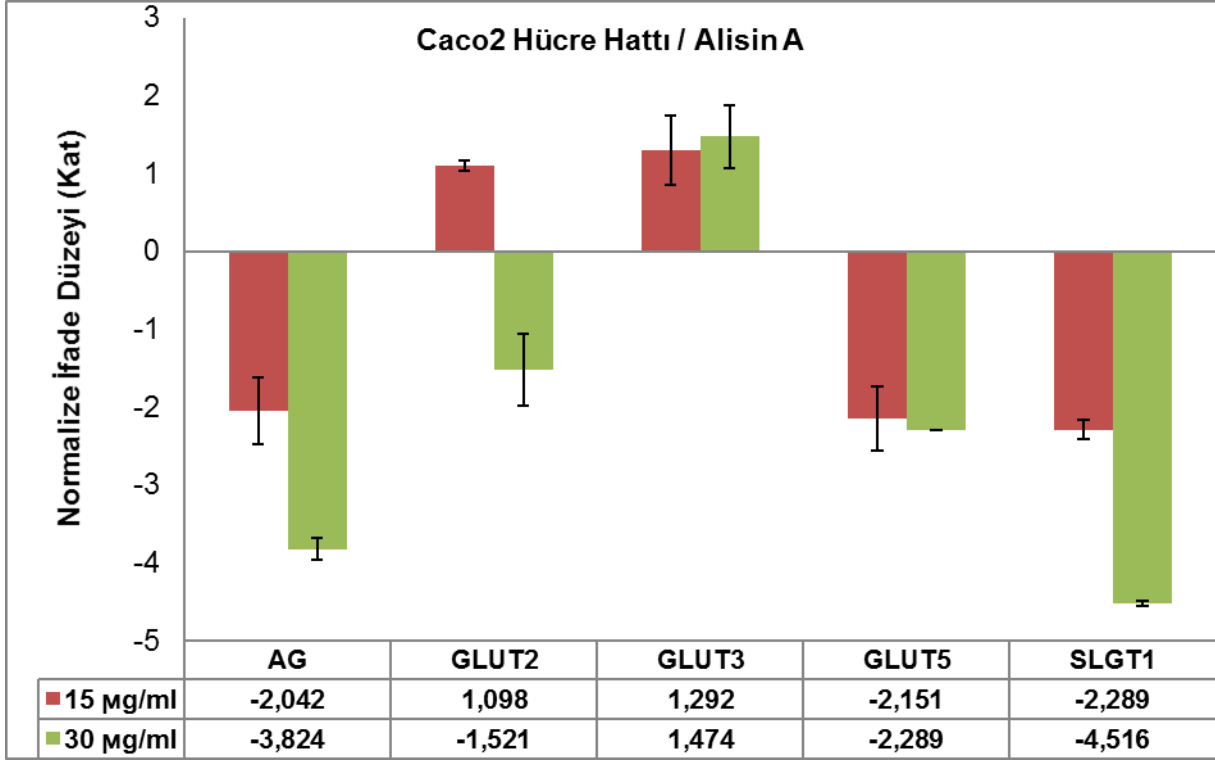


Şekil 38. Sirsiliol test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

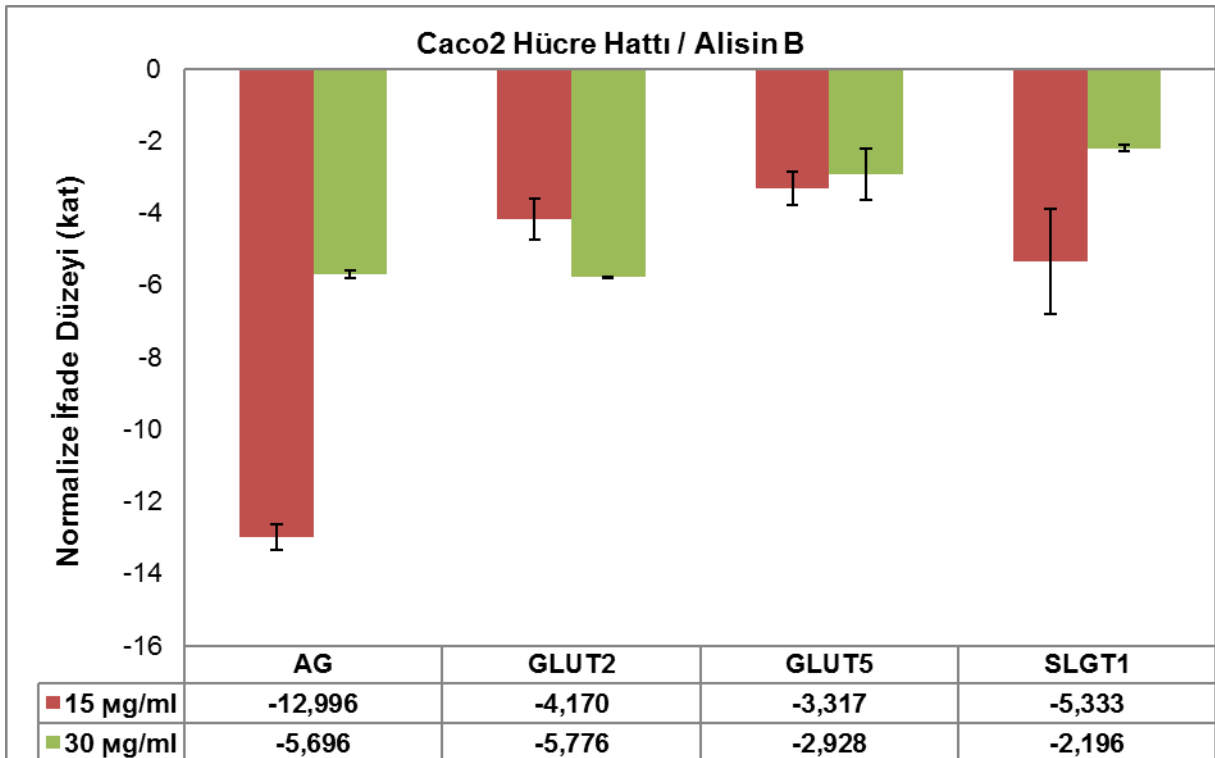


Şekil 39. Sirsilineol test bileşiğinin insan Chang karaciğer hücre hattında (Chang karaciğer) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

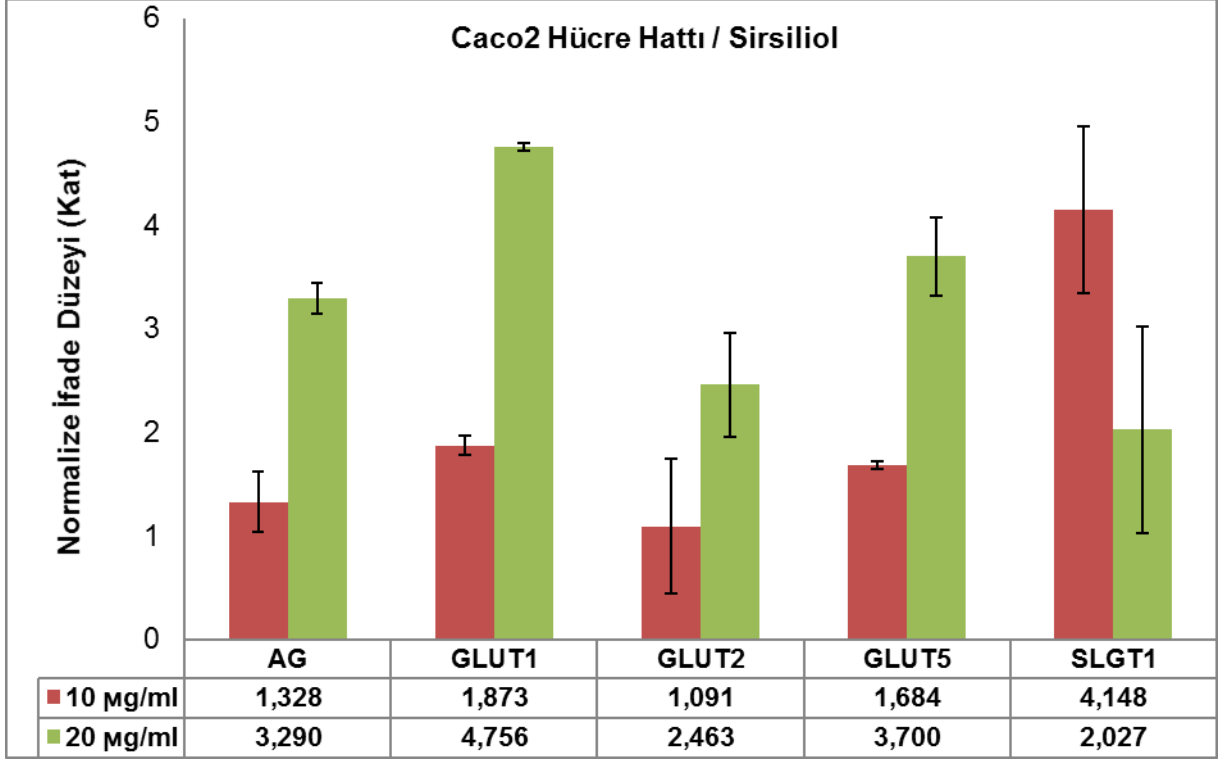
3.7.5. Test Bileşiklerin Caco-2 Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi



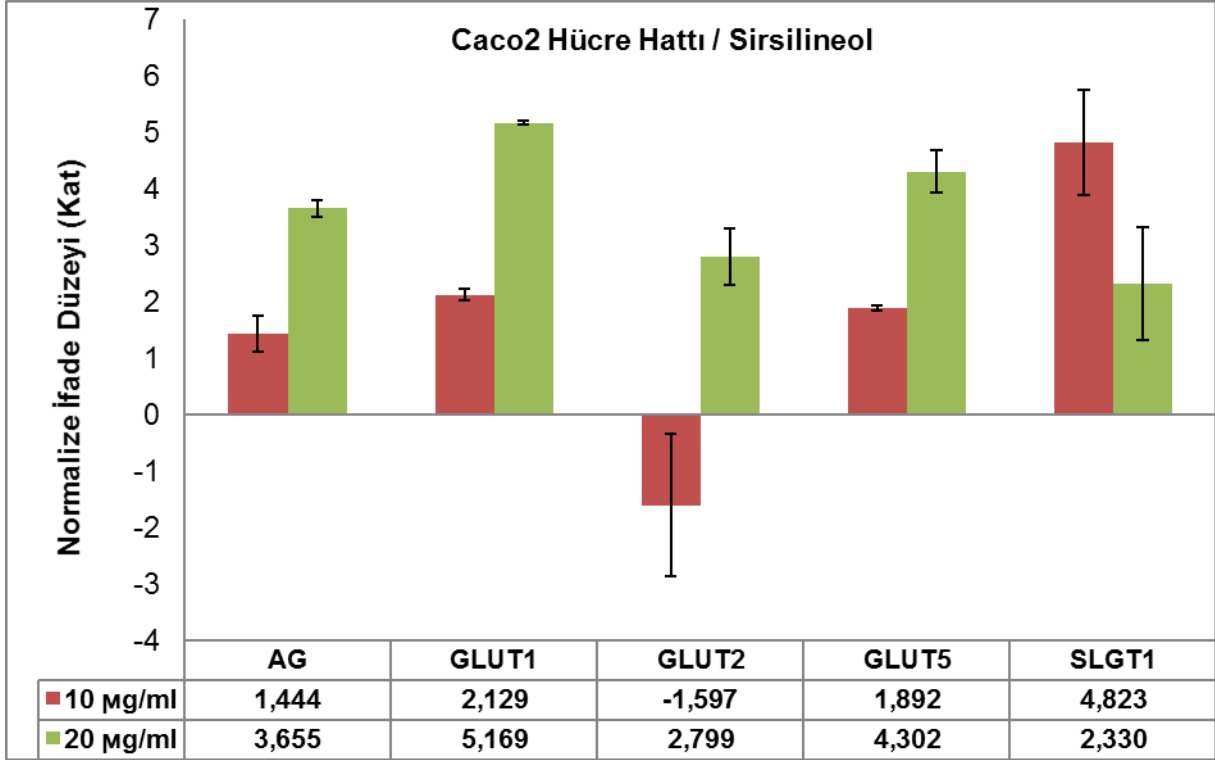
Şekil 40. Alisin A test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.



Şekil 41. Alisin B test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.



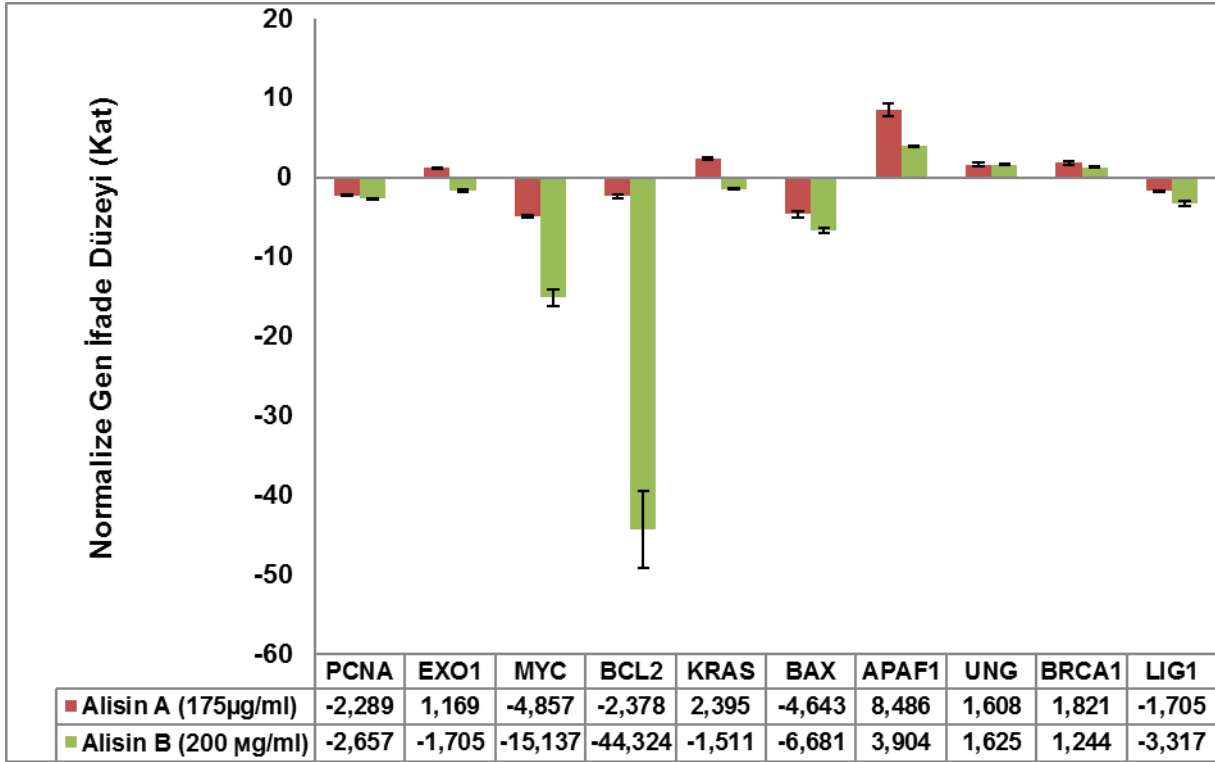
Şekil 42. Sirsiliol test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.



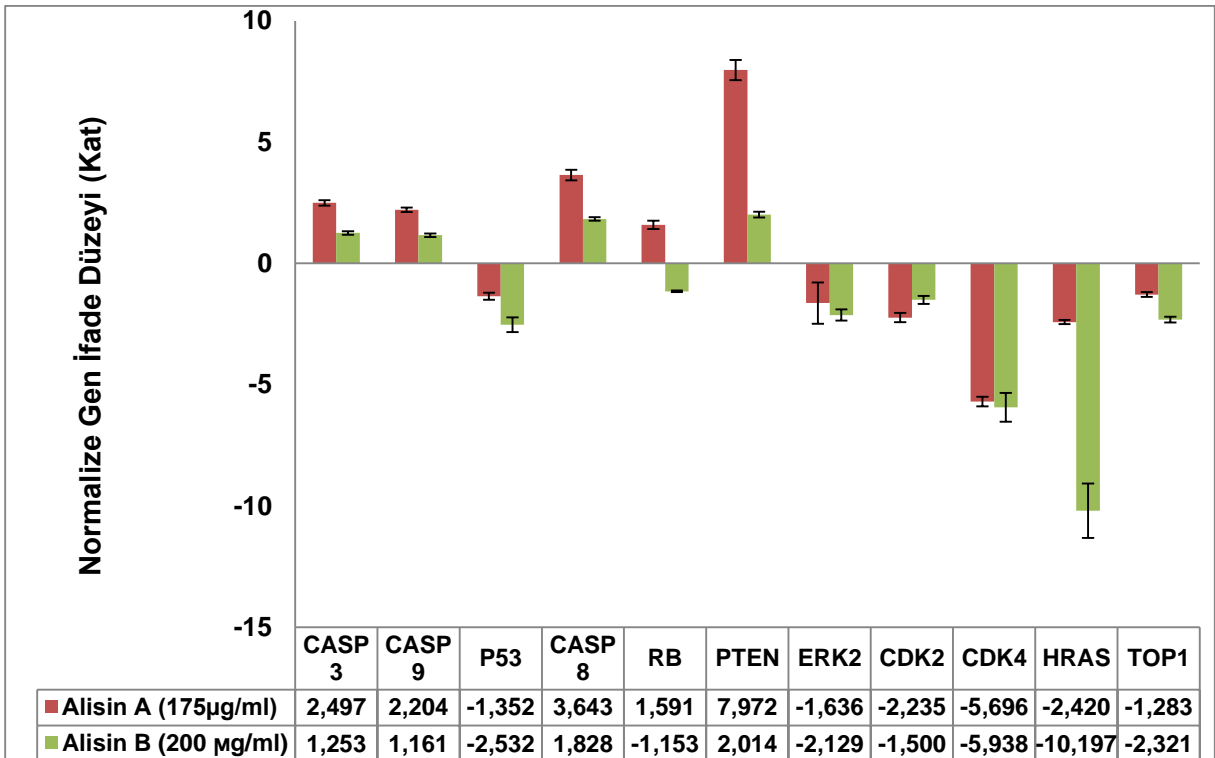
Şekil 43. Sirsilineol test bileşiğinin insan kolon adenokarsinom hücre hattında (Caco-2) diyabet ilişkili AG, GLUT2, GLUT3, GLUT5 ve SGLT1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

3.8. Test Bileşiklerin Kansere İlişkili Bazı Genlerin İfade Düzeylerine Etkisi

Proje önerisinde B planı olarak sunulan protokollerde proje kapsamında araştırmaya derinlik kazandırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Tablo 8'de verilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerini saptamak için Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantite edildi. Bu grup deneyler sadece Chang karaciğer hücre hattıyla ve elimizde yeterli sirsilin ve sirsilineol kalmadığı için sadece Alisin A ve B bileşikleriyle gerçekleştirildi. Ayrıca, bu deneylerde anti-diyabetik etki deneylerinin aksine LC50 değerleri kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 45-46).



Şekil 44. Alisin A test bileşiğinin fare miyoblast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.





Şekil 45. Alisin A test bileşiminin fare miyoplast hücre hattında (C2C12) diyabet ilişkili INRS, IRS1, IRS2, PK, PEPCK, GLUT4, AKR ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkileri. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiş ve kontrol değerleri 1 olarak alınmıştır.

4. TARTIŞMA – SONUÇ

Diyabetin önlenmesi için alternatif ve tamamlayıcı tedaviler arayışı hızla ve artan bir şekilde devam etmektedir çünkü özellikle tip II diyabet dünyamızda epidemik bir salgın halini almaya başlamıştır. Diyabet tüm dünyadaki ölümlerin ilk beş nedenlerinin birisi olarak yer almaktadır ve yapılan tahminler 2030 yılında yaklaşık 400 milyon insanın bu hastalığa yakalanacağını ve dünyanın en ölümcül üçüncü hastalığı haline geleceğini göstermektedir (Shaw vd.; 2010). Özellikle bizim toplumumuzda sürekli artan bir hastalık olması da bu çalışmalarımız için temel oluşturmuştur. Şifalı bitkilerin bilinen anti-diyabetik etkilerinden yola çıkarak yaptığımız pilot çalışmalarda olası anti-diyabetik etkisini tespit ettiğimiz *Teucrium alyssifolium* bitkisinden elde edilen dört adet saf bileşiğin anti-diyabetik etkileri bu çalışmada detaylı bir şekilde araştırıldı.

Aktif bileşiklerin anti-diyabetik etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalarda glikoz homeostazında çok önemli rol oynayan iki ana mekanizma (glikoz alınımı ve insülin salınımı) araştırmaların omurgasını oluşturmaktadır. Bizde bu çalışmamızda, bu iki ana mekanizmayı ele alan toplamda altı alt başlıkta anti-diyabetik etki mekanizmalarını inceledik. Bunlar insülin salınımı, glikoz alınımı, glikoz taşınması, glikoz emilimi, glikoz depolanması ve insülin yolağında yer alan genlerin ifade düzeylerinin saptanması olarak çalışmamızda yer aldı. Böylelikle model hücre hatlarında glikoz homeostazının detaylı bir şekilde incelenmesi sağlandı. Bu amaçla glikoz homeostazında yer alan kendine özgü metabolik yolları ve faaliyet özellikleri ile glikoz metabolizmasında yer alan bir *in vivo* organı temsil edecek uygun hücre hatları çalışmamızda kullanıldı. Bu hücre hatları 3T3-L1 preadiposit, Chang karaciğer, Caco-2 epitel, C2C12 kas ve pankreatik TC6 hücreleridir. Bu hücre hatları ile birlikte test bileşiklerinin etkilerini karşılaştırmak için pozitif kontroller olarak insülin, metmorfin (glikoz kullanımı) ve glibenklamid (insülin salgılanması) kullanıldı.

Bu projenin temel amacı her ne kadar *Teucrium alyssifolium*'dan izole edilmiş bileşiklerin *in vitro* model sistemlerde anti-diyabetik etkilerinin araştırılması olsa da; nihai hedef olarak bu metodlarının laboratuvarımızda optimize edilerek uygulanabilirliğini sağlamak, bu teknikleri gerçekleştirebilecek genç araştırmacılar yetiştirmek ve pozitif etkinlik elde edilen bileşik veya bileşikler ile de *in vivo* koşullarda gerçek etkinliklerini saptamaya gidecek çalışmalara öncülük etmesidir. Bu hedeflere de tam anlamıyla ulaşılmıştır.

Glikoz homeostazında glikozun hücre içine alınımı çok önemli bir adımdır ve çeşitli gen ve hormonların etkisi ile sıkı bir kontrol altındadır. Glikoz hücrelere GLUT adı verilen glikoz taşıyıcıları tarafından kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla alınır (Medina ve Owen, 2002).

Yeni anti-diyabetik ajanların keşfi ve tespiti için yapılacak çalışmalarda bileşiklerin ya da ajanların kullanılacağı ve çalışılacağı dozlar (antikanser ajanların aksine) toksik etki göstermedikleri dozlar olmaları gereklidir (Stein vd., 2013). Çünkü kullanılacak dozların hem model sistemlerde hem de ileri çalışmalarda *in vivo* sistemlerde kontrendikasyonlar oluşturmayacak ve toksik etkiler göstermeyecek düzeylerde olması gerekmektedir. Aksi halde toksik dozlarda gözlenen etkilerin *in vivo* uygulanabilirlikleri olmayacaktır. Bu nedenle bizde proje çalışmamızda tespit ettiğimiz dört bileşiğin öncelikle tüm model hücre hatlarımızdaki sitotoksitelerini saptadık. Her ne kadar hücre hatları ile tam NOEL (No Observed Effect Level) ve LOEL (Lowest Observed Effect Level) değerleri saptanması yapılmasa da yaklaşık değerler saptandı (Kruse vd., 2002). Tespit edilen bu toksik olmayan değerler çalışmaların tamamında kullanıldı. Genel olarak hücre canlılığına %10'dan fazla etki eden konsantrasyonlar toksiktir ve alternatif B planı olarak sunulan anti-kanser etki çalışmaları hariç bu çalışmada kullanılmadı. Test bileşiklerinin model mekanizmalarda kullanılan doz değerlerininin toksik etki göstermediği doku hasarının varlığı ve şiddet derecesinin genel bir göstergesi olarak kullanılan LDH testi ile de ayrıca teyit edildi. Hiçbir bileşik kullanılan dozlarda test ortamlarında LDH aktivitesinde anlamlı bir artışa neden olmamıştır. Bu sonuçlarımız da, hücrelerin yapısal bütünlüğünde herhangi bir deformasyon ya da bozulmaya neden olmadığı anlamına gelmektedir.

Anti-diyabetik etki araştırmaları için her bir hücre modeli ve bileşik için toksik olmayan ve en düşük etki gösteren değerlerin saptanmasından sonra, glikoz homeostasında en önemli basamak ve mekanizma olması nedeni ile uygun hücre hatlarında glikoz alınımını analiz ederek test bileşiklerinin etki çalışmalarını başlattık. Bu çalışmalarda; kas, karaciğer ve adipoz dokusuna model olmaları amacı ile sırasıyla C2C12, Chang karaciğer ve 3T3-L1 adiposit hücre hatları kullanıldı. Çünkü bu hücre hatlarında glikoz metabolizmasında insüline yanıt olarak hücre içine glikoz alan ve uygun glikoz transport taşıyıcılarını, özellikle GLUT4, ifade eden hücrelerdir. Karaciğer ise GLUT2 ifade eden önemli bir glikoz rezervi olarak görev yapan hücrelerdir. Bu amaçla öncelikle 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin adiposit hücrelerine dönüşümü Bölüm 3.3'te verildiği şekilde gerçekleştirildi. Hücrelerin dönüşümlerin ifade etkileri G3PDH aktivite artışları ile de teyit edildi.

Test bileşiklerimiz olan Alisin A, Alisin B, Sirsiliol ve Sirsilinol'un yukarıda belirlenen üç hücrede glikoz alınımına yaptığı etkiler incelendiğinde Alisin A ve Alisin B bileşiklerinin her üç hücre hattında da en az pozitif kontrol metmorfin ve insülin kadar etki ettiklerini göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler kullandığımız model hatlarının kullanılabilirliğini ve başarı ile dönüştüğünü teyit eder niteliktedir. Pozitif kontrol bileşiklerinin en fazla etki gösterdiği doku 3T3-L1 hücreleri oldu. Daha sonra da C2C12 kas ve Chang karaciğer hücre hatları oldu. Normalde fizyolojik düzeylerde GLUT4 taşıyıcısının en fazla ifade edildiği doku kas hücresidir (Gene

exspression/activity chart-BioGPS.org). Bizim deneylerimizde en yüksek glikoz alınımının adiposit hücrelerde gözlenmesi preadiposit hücrelerin adiposit hücrelere indüklenirken GLUT4 ifade düzeylerinin aşırı artışına bağlı olmuş olabilir. Netice olarak test bileşiklerimizden Alisin A ve Alisin B'nin her üç hücre hattında da glikoz kullanımı – alınımında en az insülin ve metmorfin kadar etkili olduğu gösterilirken diğer iki bileşik olan Sirsiliol ve Sirsilineol'ün bu etkiye sahip olmadıklarını tespit edildi. Alisin A ve Alisin B kas ve karaciğer hücrelerinde pozitif kontroller insülin ve metmorfinden daha fazla etki gösterirken (özellikle Chang karaciğer hücrelerinde) adiposit hücrelerde eşdeğer etkiyi göstermiştir. Alisin A ve B'nin glikoz homeostasında en önemli model olan ve glikoz dengesini sağlayan bu üç önemli dokuda pozitif etki göstermesi bu bileşikler için oldukça önemli bir özelliktir ve *in vivo* sistemde beklenen etkinlikleri için ümit verici sonuçlardır. Elde edilen sonuçlar üzerinden Alisin A ve B 'nin bu üç dokuda büyük olasılıkla GLUT4 üzerinde etki gösterdiğini söylemek mümkündür. Çünkü bu üç hücre tipinin ortak noktası, insüline cevap olarak GLUT4 aktivitelerini arttırarak (GLUT4'ün hücre yüzeyine translokasyonu ile) hücre içine glikoz taşımalarıdır.

Glikoz alınımı üzerine etkilerini test ettiğimiz test bileşiklerimizin yine glikoz homeostazının önemli bir diğer parametresi olan glikoz depolama modeli üzerine etkilerini araştırdık. Bu amaçla glikojen miktarları glikojen depolama kapasitesi olan model hücre hatlarında - C2C12 kas ve Chang karaciğer hücre hatları- pozitif kontroller ile karşılaştırılmalı olarak tayin edildi. Bu deneylerde de önceki glikoz alınımı - kullanımı ile paralel sonuçlar elde edildi. Alisin A ve Alisin B bileşiklerinin her iki hücre hattında da depolanmış glikojen miktarlarını, pozitif kontrol insüline oranla önemli ve anlamlı olarak daha fazla olacak şekilde arttırdığı gözlemlendi. Bu veriler ve önceki glikoz alınımı deneylerinden alınan sonuçlar her iki bileşiğin IR'ne etki ederek AKT yolağı üzerinden GLUT4 translokasyonunu tetiklediğine ve ayrıca AKT üzerinden glikojenogenez yolağını aktive ettiğini kuvvetle destekler niteliktedir. Tabii ki bu modeli desteklemek için daha fazla deneyler yapılması gerekmektedir. Bu grup deneylerde enteresan olan glikoz alınımına etki etmeyen Sirsiliol ve Sirsilineol bileşiklerinden Sirsilineol'ün kas üzerine etki etmezken karaciğer hücrelerinde glikojen depolanmasını anlamlı şekilde arttırması oldu. Bu etkiyi açıklayacak bir model açıklaması mevcut veriler ile pek mümkün değildir. Ayrıca sadece Chang karaciğer hücrelerinde böyle bir etki görülmesi de bir yorum getirmeyi yada olası model mekanizma önermeyi de oldukça zor kılmaktadır.

Test bileşiklerinin glikoz alınımı ve depolanması üzerine etkileri araştırıldıktan sonra yine glikoz alınımı homeostazında önemli bir diğer mekanizma olan bağırsak hücrelerinden glikoz taşınımı (transportu) üzerine olan etkileri araştırıldı. Bu deneyler için öncelikle trans kuyucuklarda Caco-2 bağırsak epitelyum hücre katmanı oluşturuldu. Daha sonra da oluşturulan bu hücre katmanı üzerinden alt bölgeye insülin bağlı glikoz taşınması ölçülmüştür. Bağırsak epitelyum hücreleri

üzerinden glikoz taşınımı birden fazla taşıyıcı sistem gereklidir (Wright vd., 2007). Öncelikle apikal yüzeyde Na-glikoz simporter taşıyıcısı (SGLT1) tarafından bir glikoz molekülü iki Na⁺ iyonu ile birlikte enterosit içerisine taşınır. Bu işlem için bazolateral yüzeyde Na-K ATPaz pompasının senkronize aktivitesine ihtiyaç vardır. Hücre içine alınan glikoz daha sonra bazolateral yüzeyde GLUT2 olarak tanımlan glikoz taşıyıcısı tarafından kana verilir.

Test bileşiklerimizin Caco-2 hücreleri üzerinden glikoz taşınımına etkileri Tablo 13'te verilmektedir. Sonuçlar tüm test bileşiklerinin enteresan bir şekilde glikoz taşınımını aktive ettiği, özellikle Alisin B bileşiğinin glikoz taşınımını daha da hızlandırdığını gösterdi. Bu sonuçlarımızda enteresan olarak; test bileşikleri ve kontrol olarak kullanılan insülin hücre katmanının apikal yüzeyinde glikoz miktarını değiştirmemesi ancak buna rağmen bazolateral yüzeyde glikoz miktarının artmasıdır. Burada taşınan glikoz apikal yüzeyden taşınan glikoz olması gerektiği ve buna bağlı azalması gerekirken sabit kalması soru işareti oluşturmaktadır. Bu deneyler üç kez tekrar edildi ve benzer sonuçlar elde edildi. Buradaki durumun daha iyi aydınlatılabilmesi için anti-SGLT1 veya anti-GLUT2 antikoları ile birlikte sağlama deneylerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Mevcut veriler ile test bileşiklerinin Caco-2 hücreleri üzerinden glikoz transportunu sitümile ettiği görülmektedir. Önceki deney sonuçlarının aksine bu durum diyabetik etkiyi destekler niteliktedir.

Glikoz homeostazında bir başka model olarak çalışılan mekanizmalar arasında α -glikosidaz inhibisyonu yer almaktadır. Bu şekilde farmakolojik olarak kullanılan ilaçlar mevcuttur. Bu amaçla bizde proje çalışmamızda Caco-2 hücrelerinin α -glikosidaz aktivitesini test ve pozitif bileşikler varlığında tespit ettik. Sonuçlarımız hiçbir bileşiğimizin Caco-2 hücrelerinde α -glikosidaz enzimi üzerine bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Yine burada daha doğru ve model veri üretebilmek için saf enzim kullanılarak aktivite ve inhibisyon testleri yapmak yerinde olacaktır. Bu durum bir eksiklik olarak görülmemektedir. Sadece daha net sonuçlar elde etmek için bu şekilde tekrar edilmesi daha faydalı olacaktır önerisi getirilmektedir. Bu noktada şunu belirtmekte fayda vardır. α -glikosidaz inhibitörleri her ne kadar anti-diyabetik gibi ele alınsa da bu bileşikler sadece bağırsaktan glikoz emilimi engelledikleri için kan glikoz düzeyini diyetle birlikte kontrol etmeye yardımcı ajanlar olarak yer almaktadır. Çünkü bu ajanlar kompleks karbonhidratlar (nişasta vb) üzerine etki ederken basit şekerler (glikoz, fruktoz vb) üzerine bir etkisi olmamaktadır. O nedenle çeşitli bileşiklerin α -glikosidaz inhibitör etkinliği olması ya da olmaması diğer modellere göre çokta önemsenmemektedir.

Glikoz homeostazında en önemli hormon olması nedeniyle anti-diyabetik etki mekanizma çalışmalarında model olarak test bileşiklerinin insülin salınımını etkileyip etkilemedikleri araştırılmaktadır. Bizde aynı amaçla proje kapsamında insülin salgılaya yetisi olan insan β -



pankreas hücreleri kullanılarak (β -TC6) test ve pozitif kontrol bileşikler varlığında insülin salgı miktarlarını saptadık. Proje kapsamında incelenen test bileşiklerimizin hiç birisinin pankreatik β -hücrelerinden insülin salınımını tetiklemediği tespit edildi. Diğer model mekanizmalarda gözlemlendiği gibi, test bileşiklerinin GLUT2 veya K^+ kanalları üzerine bir etkisinin olmadığını destekler veriler elde edildi. Tabii ki bu öneriyi destekleyecek, daha doğrudan veriler üretecek *in vivo* deneyler yapılması daha gerçekçi olacaktır.

Glikoz alınımlı ve kullanımı, insülin mimikleme gibi etki modellerinin yana sıra proje kapsamında glikoz metabolizmasında yer alan, insülin sinyal mekanizmasında görev yapan genlerin ifade düzeyleri de uygun hücre hatları kullanılarak araştırıldı. Bu genlerin genel bir derlemesi Tablo 15 ve Tablo 16'da verilmektedir. Anlamlı olarak artan yada azalan genler renklendirilerek verilmiştir. Gen ifade düzeylerinin farklı hücre hatlarında farklı şekilde etkilediği genel bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır.

Chang karaciğer hücreleri ele alındığında Alisin A ile düşük dozda IRS ifadesinin baskılandığı AKR ifadesinin arttığı; yüksek dozda IRS2 ifadesinin baskılandığı PK, PEPCK ve AKR ifadesinin arttığı görülmektedir. Sirsiliol ve Sirsilinol ise her iki doz düzeyinde INSR geninin ifade düzeyini arttırmaktadır. Bu hücre hattı için bileşiklerin gen ifade düzeylerini tek bir başlık altında toplamak mümkün değildir. Örneğin IRS geninin baskılanması insülin yolağını baskılaması düşünülürken yine bu yolağın devamında yer alan PK gen aktivitesi artmaktadır ve buda anti-diyabetik kabul edilebilecek bir gen ifadesinin artışıdır. Bununla birlikte PEPCK gen ifade düzeyinin artması başlı başına diyabetik bir etki kabul edilebilir. Birbiriyle bu derece çelişen gen ifade düzeyleri saptandı. Bu durum diğer hücre hatları içinde en fazla tekrar edilen deney grubu olarak bu gen ifade düzeyleri çalışıldı. Ancak buna rağmen sürekli değişen gen ifade düzeyleri tespit edildi. Sonuçlarda sunulan ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleridir. Elimizde bulunan önemli bir miktar test bileşikleri daha tutarlı sonuçlar elde etmek için bu deneyler için tüketildi. Maalesef daha fazla tekrar uygulamalar için yeterli bileşikler kalmamıştır. Mevcut veriler değerlendirmeye ve yorumlamaya çalışılmıştır.

Kas hücrelerinde ise, test bileşikleri Alisin A ve Alisin B'nin (özellikle Alisin A) etkileri incelendiğinde IRS2, PK, GLUT4, AKR, G6P gen ifade düzeyleri indüklenmektedir. Bu genler

Tablo 15. Düşük konsantrasyonlarda (NOEL) Alisin A (AA), Alisin B (AB), Sirsiliol (SL) ve Sirsilineol (SN) bileşiklerinin değişik hücre hattında insulin yolağı ve glikoz homeostazında yer alan çeşitli genlerin ifade düzeylerine etkileri (Kontrolle oranla normalize edilmiş kat değişiklik olarak ifade edilmektedir ve analiz sonucunda **kırmızı** renk ile verilen değerler artışı, **mavi** rankle verilen değerler azalışı temsil etmektedir).

	3T3-L1				C2C12				Chang				Caco2				BTC6			
	AA	AB	SL	SN	AA	AB	SL	SN	AA	AB	SL	SN	AA	AB	SL	SN	AA	AB	SL	SN
INSR	1,78	1,77	11,80	10,93	-1,04	1,11	1,19	1,13	1,21	-1,55	3,38	4,13								
IRS 1	-3,16	1,89	1,90	1,71	2,25	-2,25	1,50	1,34	-1,21	-2,64	1,62	1,47					1,33	2,77	2,27	2,42
IRS 2	-1,09	5,15	3,00	2,86	4,18	-1,06	-2,22	-1,99	-3,53	-16,06	1,79	2,21								
PK	2,62	3,29	2,10	2,00	1,20	-3,24	-1,97	-1,91	1,71	1,82	1,69	1,54								
PEPCK	3,89	4,42	1,56	1,45	84,16	-2,09	1,53	1,47	1,95	2,29	1,96	2,39								
GLUT4	2,28	3,63	-2,04	-1,94	5,43	-1,53	-2,21	-2,59												
AKR	-1,05	4,74	1,69	1,64	1,80	1,96	-1,72	-1,48	10,30	2,44	2,11	2,56								
PI3K	-2,08	-1,64	-1,52	-1,44			-1,89	-1,66												
G6P	2,52	2,58	1,91	1,72	1,52	-1,58	-1,97	-1,67	1,36	-1,28	1,26	1,06								
AG													-2,44	-13,00	1,33	1,44				
GLUT2													1,10	-4,17	1,87	2,13				
GLUT3													1,29		1,09	-1,60				
GLUT5													-2,15	-3,32	1,68	1,89				
SLGT1													-2,29	-5,33	4,15	4,82				
GLUT2																	54,00	1,06	3,26	2,86

Tablo 16. Yüksek konsantrasyonlarda (LOEL) Alisin A (AA), Alisin B (AB), Sirsiliol (SL) ve Sirsilinol (SN) bileşiklerinin değişik hücre hattında insulin yolağı ve glikoz homeostazında yer alan çeşitli genlerin ifade düzeylerine etkileri (Kontrolle oranla normalize edilmiş kat değişiklik olarak ifade edilmektedir ve analiz sonucunda kırmızı renk ile verilen değerler artışı, mavi rankle verilen değerler azalışı temsil etmektedir).

	3T3-L1				C2C12				Chang				Caco2				BTC6			
	AA	AB	SL	SL	AA	AB	SL	SN	AA	AB	SL	SN	AA	AB	SL	SN	AA	AB	SL	SN
INSR	2,86	1,41	5,05	4,68	-1,25	-2,80	1,63	1,48	1,28	-1,11	2,65	2,88								
IRS 1	-1,27	-1,56	-1,57	-1,44	1,16	-2,08	3,27	3,08	-2,06	-2,34	1,28	1,06					10,20	1,14	2,78	3,02
IRS 2	2,79	2,90	1,63	1,57	3,62	-1,10	1,41	1,24	-4,16	-5,21	1,29	1,61								
PK	3,68	2,98	1,17	1,06	3,28	-2,28	1,29	1,11	4,74	2,77	-1,48	-1,27								
PEPCK	14,12	2,33	-2,02	-1,82	64,45	1,69	-4,74	-4,16	4,47	2,85	-0,86	-1,05								
GLUT4	4,50	2,40	-4,87	-4,42	2,97	-5,08	1,27	1,16												
AKR	1,51	3,07	-1,29	-1,20	5,17	2,71	2,17	1,85	8,78	4,77	1,61	1,36								
PI3K	5,84	-1,41	-1,57	-1,47			1,62	1,46												
G6P	2,97	1,55	-1,13	-1,09	3,75	1,02	1,47	1,26	1,09	1,15	-1,45	-1,23								
AG													-3,82	-5,70	3,29	3,66				
GLUT2													-1,52	-5,78	4,76	5,17				
GLUT3													1,47		2,46	2,80				
GLUT5													-2,29	-2,93	3,70	4,30				
SLGT1													-4,52	-2,20	2,03	2,33				
GLUT2																	9,92	1,12	1,61	1,53

Bu genler incelendiğinde aynı yolakta koordineli çalışan ve insülin etkileriyle anti-diyabetik etki yaratan genler olduğu gözlenmektedir. Fakat bunun yanı sıra önemli bir glikoneogenez geni olan PEPCK transkriptinin inanılmaz düzeyde arttığı tespit edildi. Bununla birlikte Sirsiliol ve Sirsilineol bileşikleri PEPCK ifade düzeyini inhibe etmektedir. Bu bileşiklerin öncül çalışmalarımızda tespit ettiğimiz PEPCK ifade inhibisyonuna neden olan bileşiklerden olduğunu söylemek mümkündür. Bu iki bileşik diğer herhangi bir genin ifade düzeyinde anlamlı bir değişiklik yapmamıştır.

3T3L1 hücrelerinde gen ifade düzeyleri dikkatle incelendiğinde Alisin A ve Alisin B'nin kas hücrelerine benzer şekilde davrandıkları görülmektedir. IRS2, PK, GLUT4, AKR, PR3K gibi anti-diyabetik etki olarak kabul edilebilecek etkiler gözlemlendiği ve bu genlerin ifade düzeylerinin arttığı gözlenirken; yine kas hücrelerinde olduğu gibi ifade düzeyi aynı derece olmasa da PEPCK'nın arttığı gözlenmektedir. Benzer karşıtlık burada da söz konusudur. Ancak her 3 hücre içinde ağırlıklı olarak anti-diyabetik etkinlik sayılabilecek şekilde bir genel ifade değişikliğinin gerçekleştiğini söylemek mümkündür. Bununla birlikte β TC6 hücreleri ele alındığında ise son derece anti-diyabetik etki olarak ifade edilecek sonuçlar özellikle yine Alisin A ile tespit edilmiştir. Alisin A bu hücrelerde IRS1 ve GLUT2 ifade düzeylerini oldukça yüksek düzeylerde arttırmış durumdadır. Diğer bileşiklerin anlamlı bir etkileri gözlenmemektedir. Tabii burada önceki insülin salınımı deneyleri ile çelişir gibi veriler elde edilmiştir. GLUT2 bu hücrelerde insülin salınımını düzenleyen ve tetikleyen glikoz taşıyıcısıdır. İfade düzeyi bu kadar artmasına rağmen neden insülin salınımı artmamıştır gibi bir değerlendirme akla gelebilir. Fakat burada inkübasyon süreleri dikkate alınmalıdır. İnsülin salınım deneylerinde hücreler 30 dakika inkübe edilmekte iken, gen ifade deneyleri için hücreler test bileşikler ile tüm gece inkübe edilmektedir. Bu sonuçlar bize Alisin ile inkübasyon süresinin 2-4 saat gibi arttırılması durumunda insülin salınımını da tetikleyici olacağını önermekte ve güçlü bir şekilde desteklemektedir.

CaCo-2 hücre hattında glikoz taşıyıcılarının ifade düzeylerine test bileşiklerinin etkileri incelendiğinde Alisin A ve özellikle Alisin B GLUT2 ve SGLT1 ekspresyon düzeylerini anlamlı bir şekilde baskıladıkları gözlenmektedir. Buda CaCo-2 hücre hattında glikoz emiliminin engellenmesi olarak sonuçlanacaktır ve anti-diyabetik etki olarak kabul edilebilir. Bir önceki β TC6 hücrelerinde olduğu gibi bu hücrelerde glikoz emiliminde inhibisyon gözlenmedi. Yine benzer şekilde buradaki farklılığı inkübasyon süreleri farklılıklarına atıf edilebilir.

Glikoz taşıyıcı düzeylerinin inhibe edilmesi yanı sıra Caco-2 hücre hatlarında bir diğer önemli anti-diyabetik etki tespiti de AG ifade düzeylerinin Alisin A ve B tarafından çok önemli ve anlamlı değerlerde baskılanmasıdır. Bu etki, bileşiklerin aktivite düzeyinde etki etmediği glikoz

emilimini gen ifade düzeyinde baskılanmasıdır ki kompleks karbonhidratların emilimine önemli düzeyde azaltarak anti-diyabetik özellik göstermelerini sağlamaktadır. Diğer iki bileşikte ise tersine sonuçlar elde edildi. Sirsiliol ve Sirsilinol'ün Caco-2 hücrelerinde diyabetik etki göstermeleri kuvvetle muhtemeldir çünkü hem glikoz taşıyıcıları ve hem de AG düzeyini anlamlı olarak indüklemektedirler.

Gen ifade düzeylerini test bileşiklerin genel bir derleme ve değerlendirmesini yaptığımızda bir gen (PEPCK) düzeyinde çelişkiler yer almakla birlikte Alisin A ve Alisin B bileşiklerinin genel anlamda anti-diyabetik etkiler oluşturduğu görülmektedir ve bunu ileri sürmek yanlış olmayacaktır. Özellikle β -TC6 hücrelerinde insülin salınımında yer alan genleri indüklemesi önemlidir (bu çalışmada kullandığımız Caco-2 ile birlikte insan hücre hatları olması açısından ayrı bir anlam ve değer taşımaktadır). Caco-2 hücrelerinde (yine insan hücre hattı) α -glikosidaz (AG) ve GLUT2 ifadelerini baskılaması ve diğer üç hücre hattında genelde anti-diyabetik etki ile sonuçlanacak genlerin ifade düzeylerinde değişiklik oluşturmaları bu hipotezimizi çok önemli destekleyen verilerdir.

Bir genin ifade düzeyinin birden fazla noktada düzenlendiği göz önüne alındığında genlerin sadece mRNA düzeylerine bakarak gen ifadesi hakkında kesin bilgi sunmanın doğru olmadığı çok iyi bilinmektedir (Muers, 2013). Özellikle mRNA sentezinden sonra bir çok basamakta ve translasyon evresinde de önemli kontrol mekanizmaları olduğu gerçeği ile gen ifade çalışmalarını daha kesin bir dil ile ifade edebilmek için, ilgili genlerin protein düzeylerinin ve aktivitelerinin tespit edilmesi zorunludur. Bu çalışmada hem kapsam hem de ekonomik nedenler ile protein düzey ve aktivite çalışmaları gerçekleştirilmedi. Buna rağmen, literatürde birçok çalışmada sadece mRNA düzeylerinin kantite edildiği gerçeğini de göz önüne alındığında, yine de sonuçlarımızın bir anlam ifade ettiği ve önemli veriler olduğu da bir bilimsel gerçektir.

Bu noktada bileşiklerin güçlü apolar karakterde olması ve hücre zarlarından serbest geçişleri nedeniyle hücre içerisinde birden fazla promotör bölgesine etki etmesi veya birden fazla promotör bölgesine etki eden ajanlara ve faktörlere etki etmesi; ve bu farklı promotörler arasında ki etkinliklerinin oransal farklılıkları bu şekilde bir gen etkinliğine neden olmuş olabilir. Benzer şekilde değişkenlik forbal esterler içinde literatürde bildirilmektedir (Lebkowski vd., 1987). Özellikle yakın olan farklı dozlarda birbirine zıt etkiler ortaya koyması bu hipotezi doğrular niteliktedir. Ancak hipotezin tam olarak doğrulanması için bileşiklerin daha fazla konsantrasyonlarıyla denemeler yapılması gereklidir.

Her ne kadar proje önerisinde B- planı olarak sunulmuş olsa da test bileşiklerimizden ikisi ile (çünkü sirsiliol ve sirsilinol bileşikleri elimizde yeterli miktarda kalmamıştır.) anti-kanser



genlerinin ifade düzeylerine olan etkileri çalışıldı ve tespit edildi. Sitotoksikite deneylerinden de görüleceği üzere bileşikler aslında anti-kanser olarak kullanılacak dozlar değildir. Genelde bileşiklerimiz, sitotoksik etkileri düşük olan bileşiklerdir ve genelde antikanser ajanların düşük dozlarda yüksek etki göstermeleri beklenir. Buna rağmen elimizde kalan bileşiklerle kanser ilişkili genlerin ifade düzeyleri çalışıldı. Çalışılan genlerden özellikle apoptotik genlerden APAF1, CASP3, CASP8 genlerinin ifade düzeyleri artarken; kanser ilişkili hücre döngüsünü bölünme yönünde teşvik eden genlerden MYC, HRAS, CDK4 ifade düzeylerinin anlamlı bir şekilde baskılandığı tespit edildi. Bu verilerin, diyabetik veriler ile birleştirildiğinde anti-diyabetik etkinlik için kullanılmaları durumunda, bir başka etki olarak anti-kanserojenik etki göstermesi kuvvetle muhtemeldir ve artı bir değer olarak değerlendirilebilir. Burada, bir noktayı da belirtmeden geçemeyeceğiz. Elde ettiğimiz veriler, proje kurgumuzun ve tasarımımızın ne kadar doğru ve gerekli olduğunu göstermesi açısından da önemlidir. Proje kapsamında, anti-diyabetik etki araştırması için bir tek veya birkaç model mekanizma seçilmemiştir. Tam aksine, *in vitro* sistemlerde yapılabilecek hemen hemen tüm glikoz homeostaz modelleri ve etki yöntemleri proje kapsamına alınmıştır. Örneğin sadece gen ifade düzeyleri ele alınmış ya da glikoz taşınımı gibi modeller ele alınmış olsa idi Alisin A ve Alisin B için anti-diyabetik demek mümkün olmayacaktı. Hâlbuki altı genel model mekanizma araştırılarak daha geniş bir pencereden bakmak ve genel resmi görmek daha mümkün olmuştur. Bu amaçla da hızlı destek ve dar bütçeli olmasına rağmen detay çalışmalardan kaçınılmamış, üniversitemiz BAP bütçesinden elde edilen katkı ve laboratuvarımızda yürüyen diğer proje bütçelerinden de katkı sağlanarak deneyler fedakarlıkla gerçekleştirilmiştir.

5. SONUÇ

Proje kapsamında elde edilen veriler, analiz edilen dört test bileşiğinden Sirsiliol ve Sirsilinol'un anti-diyabetik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Hatta bu iki bileşik diyabetik olarak bile kabul edilebilir. Ancak diğer iki bileşik Alisin A ve Alisin B'nin çalışılan glikoz homeostazında önemli rol oynayan model mekanizmalardan özellikle glikoz alınımları ve kullanım mekanizmaları, alınan glikozun depolanması mekanizmaları üzerinde çok önemli etki gösterdikleri tespit edildi. Ayrıca, bu iki bileşiğin glikoz metabolizmasında ve insülin sinyal yolağında rol oynayan anahtar genlerin ifade düzeylerinde de sonuç anti-diyabetik olacak şekilde değişiklikler yapıldığı da saptandı. İlave olarak, bu iki bileşiğin pankreatik hücrelerde insülin salınımını tetikleyecek ve bağırsaklardan glikoz emilimini engelleyecek mekanizmaları da uyardığı dolaylı olarak tayin edildi. Alisin A ve B incelenen glikoz homeostazında önemli olan mekanizmaların hemen hepsinde pozitif veriler ortaya koyarak doğal ve pleotropik anti-diyabetik ajan oldukları yönünde önemli veriler üretildi. Bunu yanı sıra her iki bileşiğin düşük dozlarda bu etkileri gerçekleştirmeleri ve bu dozlarda kanser gibi bir diğer önemli bir patolojik durum için de koruyucu yan etkilere sahip olması bir diğer artı değer ve dikkat çekici durumdur.

Sonuç olarak, Alisin A ve Alisin B bileşiklerinin *Teucrium alyssifolium*'un önceden bildirilen anti-diyabetik etkilerinden sorumlu olmaları çok kuvvetle muhtemeldir. Elde edilen veriler bu iki bileşiğin *in vivo* sistemlerde çalışılması için çok önemli sonuçlardır. Mevcut veriler bu bileşiklerin deneysel diyabetik hayvan modellerinde etkileri mutlaka çalışılmasını öngörmektedir çünkü anti-diyabet etkinlik için son derece pozitif ve yeni ajan/ilâç olarak tayin edilmesi oldukça olasıdır.

6. KAYNAKLAR

- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F. 2000. "The c-Jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307". *Journal of Biological Chemistry*, 275 (12), 9047-9054. doi: 10.1074/jbc.275.12.9047.
- Almind, K., Inoue, G., Pedersen, O., Kahn, C.R. 1996. "A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling: evidence from transfection studies" *J Clin Invest* 97, 2569 –2575.
- Altarejos, J.Y., Montminy, M. 2011 "CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(3), 141–51.
- Annadurai, T., Muralidharan, A.R., Joseph, T., Hsu, M.J., Thomas, P.A., Geraldine, P. 2012. "Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats" *J. Physiol Biochem.* 68, 307-318doi: 10.1007/s13105-011-0142-y.
- Artursson, P. 1990. "Epithelial transport of drugs in cell culture: I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells" *J. Pharm. Sci.* 1990, 79, 476-482.
- Babu, P.V.A., Liu, D.M., Gilbert, E.R. 2013. "Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids" *J.Nutr. Biochem.*, 24,1777-1789. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.06.003.
- Bailey, C.J., Day, C., 1989. "Traditional treatment for diabetes". *Diabetes Care* 12, 553–564.
- Bayley, J.P., Devilee, P. 2012 "The Warburg effect in 2012", *Curr Opin Oncol* 24(1), 62–7.
- Bissonnette, P., Gagne, H., Coady, M.J., Benabdallah, K., Lapointe, J.Y.; Berteloot, A. 1996. "Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.*, 270, G833-43.
- Bornfeldt, K.E., Tabas, I. 2011."Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis", *Cell Metab.* 14(5), 575–85.
- Brownlee, M. 2005. "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism", *Diabetes*, 54,1615–1625.

- Brunetti, A., Maddux, B.A., Wong, K.Y. and Goldfine, I.D. 1989. "Muscle cell differentiation is associated with increased insulin receptor biosynthesis and messenger RNA levels", *Journal of Clinical Investigation*; 83(1), 192-198.
- Caruso, M., Ma, D, Msallaty, Z., Lewis, M., Seyoum, B., Al-janabi, W., Diamond, M., Abou-Samra, A.B., Højlund, K., Tagett, R., Draghici, S., Zhang, X., Horowitz, J.F., and Yi, Z. 2014. "Increased Interaction with Insulin Receptor Substrate-1, a Novel Abnormality in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes", *Diabetes*, doi: 10.2337/db13-1872.
- Cell Signalling Technology. "Detailed signal transduction mechanisms of insülin". www.cellsignal.com. October 15, 2015.
- Chang, T-S., Huang, S-F., Yang, T-C., Chan, F-N., Lin H-C. and Chang, W-L. 2007. "Effect of Ginsenosides on Glucose Uptake in Human Caco-2 Cells Is Mediated through Altered Na⁺/Glucose Cotransporter 1 Expression" *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1993-1998.
- Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.F. 2010 "Insulin signaling meets mitochondria in Metabolism", *Trends Endocrinol. Metab.* 21(10), 589–98.
- Clore, J.N., Stillman, J., Sugerman, H. 2000. "Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes", *Diabetes* 49, 969-974.
- Constantin, R.P., Bracht, A., Yamamoto, N.S., Ishii-Iwamoto, E.L., Constantin, J. 2014. "Molecular mechanisms of citrus flavanones on hepatic gluconeogenesis" *Fitoterapia*, 92, 148-162. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.11.003.
- Cui, L., Lee, H.S., Ndinteh, D.T., Mbafor, J.T., Kim, Y.H., Le, T.V.T., Nguyen, P.H., Oh, W.K. 2010. "New Prenylated Flavanones from *Erythrina abyssinica* with Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitory Activity" *Planta Medica*, 76, 713-718. doi: 10.1055/s-0029-1240682.
- Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J. et al. 2011. "National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants" *Lancet*, 378(9785):31–40.
- Demir, G., Altundağ, S., Kılınçarslan, Ö. 2013. "Hibiscus sabdariffa, Teucrium alyssifolium ve Myrtus communis'in HepG2 hücre hattında antidiyabetik etkilerinin araştırılması. Yayınlanmamış Bitirme Tezi. 2013. PAÜ.

- Esmaeili, M.A. and Yazdanparast, R. 2004. "Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets", *Journal of Ethnopharmacology* 95, 27–30.
- Fritsche, L., Weigert, C., Häring, H.U., Lehmann, R. 2008. "How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease", *Curr. Med. Chem.*, 15(13), 1316–29.
- Fröde, T.S. and Medeiros, Y.S. 2008. "Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity.", *J. Ethnopharm.*, 115, 173–183.
- Gallagher, E.J., LeRoith, D. 2011. "Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1243, 54–68.
- Genet, C., Strehle, A., Schmidt, C., Boudjelal, G., Lobstein, A., Schoonjans, K., Souchet, M., Auwerx, J., Saladin, R., Wagner, A. 2010. "Structure–activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes", *J. Med. Chem.*, 53, 178–190.
- George, N., Kumar, T.P., Antony, S., Jayanarayanan, S., Paulose, C.S. 2012. "Effect of vitamin D3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats", *Br J Nutr.*, 108(8), 1410-8.
- Gętek, M., Czech, N., Muc-Wierzoń, M., Grochowska-Niedworok, .E, Kokot, T., Nowakowska-Zajdel, E. 2014. "The Active Role of Leguminous Plant Components in Type 2 Diabetes", *Evid Based Complement Alternat Med.*; 2014:293961. Epub 2014.
- Gharaibeh, M.N., Elayan, H.H., Salhab, A.S. 1988. "Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*", *Journal of Ethnopharmacology* 24, 93–99.
- Goodyear, L.J., Giorgino, F., Sherman, L.A., Carey, J., Smith, R.J., Dohm, G.L. 1995. "Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects", *J. Clin. Invest.* 95, 2195-2204.
- Gorovits, N., Charron, M.J. 2003 "What we know about facilitative glucose transporters", *Biochemistry and Molecular Education* 31(3), 163-172.
- Habtemariam, S. 2012. "The anti-obesity potential of sigmoidin A" *Pharmaceutical Biology*, 50, 1519-1522. doi: 10.3109/13880209.2012.688838.



- Harris, D.S., Slot, J.W., Geuze, H.J., James, D. E. 1992. "Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 7556-7560.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. 1989. "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco 2) as a model for intestinal epithelial permeability", *Gastroenterology* 1989, 96, 736-749.
- J Kruse, J., Verhar, H.J.M., de Raat, W.K. 2002. *The Praclinical Applicability Of Toxicokinetic Models In Risk Assessment Of Chemicals*. Kluwer Academic Publishers.
- Jeong, Y.W., Lee, G.-S., Kim, J.J., Park, S.W., Ko, K.H., Kang, M., Kim, Y.K., Jung, E.-M., Hyun, S.H., Shin, T., Jeung, E.-B., Hwang, W.S. 2012. "Establishment of a canine model of human type 2 diabetes mellitus by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase", *International Journal of Molecular Medicine*, 30, 321-329.
- Katzung, B.G. 1995. "Basic and Clinical Pharmacology. 6th Ed Appleton and Lange :448-457, 637-650.
- Kim, Y.S., Kim, N.H., Jung, D.H., Jang, D.S., Lee, Y.M., Kim, J.M., Kim, J.S. 2008. "Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF-beta2 expression in human lens epithelial cells", *Eur J Pharmacol* 2008, 594, 8–25.
- Kimura, K., Lee, J.H., Lee, I.S., Lee, H.S., Park, K.H., Chiba, S. 2004. "Two potent competitive inhibitors discriminating alpha-glucosidase family I from family II", *Carbohydr Res*, 339,1035-40.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. 2011. "α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes", *Phcog Rev*, 5, :19-29.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. 2011. "α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes", *Phcog Rev*, 5, :19-29.
- Kumar, V., Ahmed D., Verma, A., Anwar, F., Ali M. and Mujeeb, M. 2013. "Umbelliferone β-D-galactopyranoside from *Aegle marmelos* (L.) corr. an ethnomedicinal plant with antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidative activity". *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 273.
- Laakso, M., Malkki, M., Kekalainen, P., Kuusisto, J., Deeb, S.S. 1994. "Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes", *J Clin Invest* 94, 1141 –1146.

- Larner, J., Price, J., Picariello, T., Huang, L. 1997. "Method of treating defectiglucose metabolism using synthetic insulin substances", United States Patent.
- Lebkowski, J. S., McNally, M. A., Okarma, T. B., & Lerch, L. B. 1987. "Inducible gene expression from multiple promoters by the tumor-promoting agent, PMA.", *Nucleic Acids Research*, 15(21), 9043–9055.
- Leney, S.E., Tavaré, J.M. 2009. "The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: Signalling, trafficking and potential drug targets (Review)" *Journal of Endocrinology* Volume 203, 1-18
- Bogan, J.S. 2012. "Regulation of Glucose Transporter Translocation in Health and Diabetes", *Annual Review of Biochemistry*,. 81, 507-532. doi: 10.1146/annurev-biochem-060109-094246.
- Lienhard, G.E., Slot, J.W., James, D.E., Muecklar, M.M. 1992. "How cells absorb glucose", *Scientific American* 206: 34-39.
- Lin, C.C. 1992. "Crude drugs used for the treatment of diabetes mellitus in Taiwan". *American Journal of Chinese Medicine*, 20, 269-279.
- Liu, C., Wong, P., Lii, C., Hse, H. and Sheen, L. 2006. "Antidiabetic effect of garlic oil but not diallyl disulfide in rats with streptozotocin-induced diabetes", *Food and Chemical Toxicology* 44, 1377–1384.
- Lv, H.W., Zhu, M.D, Luo, J.G., Kong, L.Y. 2014. "Antihyperglycemic glucosylated coumaroyltyramine derivatives from *Teucrium viscidum*", *J Nat Prod.* 77(2), 200-5. doi: 10.1021/np400487a.
- Mahraoui, L., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A., Rousset, M., Brot-Laroche, E. 1994. "Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption", *Biochem. J.*, 298, 629-633.
- Mathers, C.D., Loncar, D. 2006. "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030", *PLoS Med*, 2006, 3(11): e442.
- Medina R. A, Owen G. I. 2002. "Glucose transporters: expression, regulation and cancer.", *Biol. Res.*, 35(1), 9-26.
- Medina, R.A., Owen, G.I. 2002. "Glucose transporters: expression, regulation and cancer", *Biol. Res.* 35, 9-26.

- Mesonero, J., Matosin, M, Cambier, D., Rodriguez-Yoldi, M. J., Brot-Laroche, E. 1995. "Sugar-dependent expression of the fructose transporter GLUT5 in Caco-2 cells", *Biochem. J.*, 312, 757-762.
- Mosihuzzman, M., Naheed, S., Hareem, S., Talib, S., Abbas, G., Khan, S.N., Choudhary, M.I. Sener, B., Tareen, .B., Israr, M. 2013. "Studies on alpha-glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*" *Life Sciences*, 92, 187-192. doi: 10.1016/j.lfs.2012.11.022.
- Muers, M. 2013. "Gene regulation: Determining global and specific regulation.", *Nat. Rev. Gen.*, 14, 368.
- Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D. 2001. "Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors". *Endocr Rev* 22: 818–835.
- Nandan, S.D., Beale, E.G. 1992. "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in mouse liver, kidney, and fat tissues by fasting, diabetes, and insulin", *Laboratory Animal Science* 42, 473-477.
- Nandi, A., Kitamura, Y., C. Ronald Kahn R., Domenico Accili, D. 2004. *Physiological Reviews* 84, 623-647. doi: 10.1152/physrev.00032.2003.
- Nedachi, T. and Kanzaki, M. 2006. "Regulation of glucose transporters by insulin and extracellular glucose in C2C12 myotubes" *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 291: E817–E828.
- Nehal, M., Baquer, N.Z. 1989. "Effect of diabetes and insulin-induced hypoglycemia on hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in red blood cells", *Biochemistry International* 19, 185-191.
- Nisha, P., Mini, S. 2013 "Flavonoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescence down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats". *Journal of Functional Foods*, Volume 5 (4) 1838-1847.
- Nugroho, A.E., Lindawati, N.Y., Herlyanti, K., Widyastuti, L., Pramono, S. 2011. "Anti-diabetic effect of a combination of andrographolide-enriched extract of *Andrographis paniculata* (Burm f.) Nees and asiaticoside-enriched extract of *Centella asiatica* L. in high fructose-fat fed rats", *Indian J Exp Biol.*, 51(12), 1101-8.



- Obrosova, I.G., Minchenko, A.G., Vasupuram, R., White, L., Abatan, O.I., Kumagai, A.K., Frank, R.N., Stevens, M.J. 2003. "Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats", *Diabetes*, 52, 864–871.
- Oshima, Y., Sato, K., Hikino, H. 1987. "Isolation and Hypoglycemic Activity of Quinquefolans A,B, and C, Glycans of *Panax quinquefolium* Roots", *J. Nat. Prod.*, 1987, 50 (2), 188–190.
- Parthasarathy, C., Renuka, V.N. and Balasubramanian, K.2009. "Sex steroids enhance insulin receptors and glucose oxidation in Chang liver cells" *Clinica Chimica Acta*, 399, 49-53.
- Patel, M.B., Mishra, S.H. 2008. "Cell lines in Diabetes Research: A Review", *Pharmacognosy Review*, 2(4),188-205.
- Pergola, P.E., Krauth, M., Huff, J.W., Ferguson, D.A., Ruiz, S., Meyer, C.J., Warnock, D.G. 2011a. "Effect of Bardoxolone Methyl on Kidney Function in Patients with T2D and Stage 3b–4 CKD". *American Journal of Nephrology*, 33 (5), 469–476. doi:10.1159/000327599.
- Pergola, P.E., Raskin, P., Toto, R.D., Meyer, C.J., Huff, J.W., Grossman, E.B., Krauth, M., Ruiz, S., Audhya, P., Christ-Schmidt, H., Wittes, J., Warnock, D.G., 2011b. "Bardoxolone Methyl and Kidney Function in CKD with Type 2 Diabetes", *New England Journal of Medicine*, 365, 327–336.doi:10.1056/NEJMoa1105351.
- Poitout, V., Stout, L. E., Armstrong M. B. 1995. "Morphological and functional characterization of betaTC-6 cells". *Diabetes*, 44:306-314.
- Pushparaj, P.N., Tan, B.K.H., Tan, C.H., 2001. "The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocindiabetic rats". *Life Sciences* 70, 535–547.
- Rahal, A., Mahimab, Verma, A.K., Kumar, A., Tiwari, R., Kapoor, S., Chakraborty, S., Dhama, K. 2014 "Phytonutrients and nutraceuticals in vegetables and their multi-dimensional medicinal and health benefits for humans and their companion animals: A review", *Journal of Biological Sciences*, 14, 1-19.
- Ramadhan, R., Phuwapraisirisan, P., 2015. "New arylalkanones from *Horsfieldia macrobotrys*, effective antidiabetic agents concomitantly inhibiting α -glucosidase and free radicals". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 25, Issue 20, Pages 4529-4533, ISSN 0960-894X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.08.069>.



- Rengarajan, S., Parthasarathy, C., Anitha, M. and Balasubramanian, K. 2007 "Diethylhexylphthalate impairs insulin binding and glucose oxidation in Chang liver cells", *Toxicology in Vitro*, 21, 99-102.
- Rowland, A.F., Fazakerley, D.J., James, D.E. 2011. "Mapping insulin/GLUT4 circuitry", *Traffic*, 12(6), 672–81.
- Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. 2001."Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid Metabolism", *Nature*, 414: 799–806.
- Schultze, S.M., Hemmings, B.A., Niessen, M., Tschopp, O. 2012.."PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis", *Expert Rev Mol Med*, 11,14:e1. doi: 10.1017/S1462399411002109.
- Sechi, .I.A., Griffin, C.A., Grady, E., Grunfeld, C., Kalinyak, J.E., Schambelam, M. 2012. "Tissue-specific regulation of insulin receptor mRNA in rats with STZ-induced diabetes mellitus", *Diabetes*, 41,1113-1118.
- Sesti, G., Federici, M., Hribal, M.L., Lauro, D., Sbraccia, P. and Lauro, R. 2001 "Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders, *The FASEB Journal*,15, 2099-2111. doi:10.1096/fj.01-0009rev.
- Sesti, G., Federici, M., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R. 2001. "Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms", *Diabetes Metab Res Rev.*, 17(5), 363-73.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z. 2010. "Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030", *Diabetes Res.Clin. Prac*, 87(1), 4-14.
- Siddle, K. 2011. "Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players", *J. Mol. Endocrinol.* 47(1), R1–10.
- Skelin, M., Rupnik, M. and Cencič, A. 2010. "Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research", *Altex* ,27, 105-113.
- Stein, S. A., Lamos, E. M., & Davis, S. N. 2013. "A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs.", *Expert Opin. Drug Safety*, 12(2), 153–175.
- Sung, J.K., Koh, J.H., Lee, M.Y., Kim, B.H., Nam, S.M., Kim, J.H., Yoo, J.H., Kim, S.H., Hong, S.W., Lee, E.Y., Choi, R., Chung, C.H. 2010. "Aldose reductase inhibitor ameliorates renal



- vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Yonsei Med J* 2010, 51, 385–391.
- Thorens, B., Mueckler, M. 2010. “Glucose transporters in the 21st Century (Review)” *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 298, E141-E145.
- Topcu, G., Eris, C., Kurucu, S., Ulubelen, A. 1996. “A new flavanone from *Teucrium alyssifolium*”. *Turkish Journal Of Chemistry*, 20, 265-267.
- Topcu, G., Eris, C., Ulubelen, A. 1997. “neo-Clerodane diterpenoids from *Teucrium alyssifolium*” *Journal of Natural Products*, 60, 1045-1047.
- Topcu, G., Eriş, C., Ulubelen, A., Krawiec, M. and. Watson W.H. 1995. “New Rearranged Neoclerodane Diterpenoids from *Teucrium alyssifolium*”, *Terrahedron*, 51, 11793-11800.
- Trapp, C., Barnard, N., Katcher, H. 2010. “A plant-based diet for type 2 diabetes: scientific support and practical strategies”, *Diabetes Educ*; 36(1), 33-48. doi: 10.1177/0145721709357797.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M., and Ramachandran, J. 1985. “Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes”, *Nature* 313, 756-761, doi:10.1038/313756a0.
- Unakal, C. and Mercy Newman, M. 2014. “Antidiabetic activity of *Amaranthus dubious* ethanolic leaf extract on alloxan induced diabetic mice” *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(2), 584-590.
- Van de Venter, M., Roux, S., Bungu, L.C., Louw, J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Maharaj, V., Pillay, P., Sewnarian, P., Bhagwandin, N. and Folb, P. 2008. “Antidiabetic screening and scoring of 11 plants traditionally used in South Africa”. *Journal of Ethnopharmacology*; 119, 81-86.
- Vilsbol, T., Brock, B., Perrildt, H., Levin, K., Lervang, H. H., Kolendorf, K., Krarup, T., Schmitz, O., Zdravkovic, M., Le-Thi, T., Madsbad, S. 2007. “Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, improves pancreatic B-cell function and arginine-stimulated insulin secretion during hyperglycaemia in patients with Type 2 diabetes mellitus”. *DiabeticMedicine*. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2007.02333.x.
- Wong, R.H., Sul, H.S. 2010, “Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective”, *Curr Opin Pharmacol*, 10(6), 684–91.



World Health Organization. "Diabetes". 4 April 2014.

World Health Organization. 2009. "Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks". Geneva,

Wright, E. M., Hirayama, B. A. and Loo, D. F. 2007. "Active sugar transport in health and disease.", *J. Internal. Med.*, 261, 32–43.

Yong, H.L., White, M.F. 2004. "Insulin receptor substrate proteins and diabetes", *Archives of Pharmacal Research*, 27, 361-370.

Zelezniak, A., Pers, T.H., Soares, S., Patti, M. E., Patil, K. R. 2010. "Metabolic Network Topology Reveals Transcriptional Regulatory Signatures of Type 2 Diabetes", *PLoS Comput Biol* 6(4): e1000729, doi:10.1371/journal.pcbi.1000729.

ZenBio Instruction Manual ZBM0009.02 3T3-L1 Cell Care Manual: Maintenance and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes NC, USA 2010 ZenBio Inc.

Zhou, J., Chan, L., Zhou, S. 2012. "Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease", *Curr Med Chem.*, 19, 3523-31.

Zima, A., Hosek, J., Treml, J., Muselik, J., Suchy, P., Prazanova, G., Lopes, A., Zemlicka, M. 2010. "Antiradical and Cytoprotective Activities of Several C-Geranyl-substituted Flavanones from *Paulownia tomentosa* Fruit" *Molecules*, 15, 6035-6049. doi: 10.3390/molecules15096035.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ALAATTİN ŞEN
Proje No:	114Z640
Proje Başlığı:	Teucrium alyssifolium'dan İzole Edilmiş Olan Alisin A, Alisin B (Diterpen), Sirsiliol ve Sirsilineol (Flavanoid) Bileşiklerinin in vitro Anti-Diyabetik Etkilerinin Araştırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	GÜLAÇTI TOPÇU
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. FEN-EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/09/2014 - 01/09/2015
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	30000.0
Öz:	<p>Diabetes mellitus yaygın metabolik bozukluklardan biridir ve dünyada toplam nüfusun % 1,5'u bu hastalıktan muzdariptir. İnsülin yanı sıra sülfonilüreler ve biguanidler gibi oral hipoglisemik ajanlar hala hastalığın tedavisinde kullanılan en önemli ajanlar olmasına rağmen, hastalığın tam bir tedavisi için daha etkili bir anti-diyabetik maddenin geliştirilmesi için arayışlar durmaksızın devam etmektedir.</p> <p>Laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz pilot çalışmalar Teucrium alyssifolium ekstresinin anti-diyabetik etkisini kuvvetle destekleyen kanıtlar nitelikteydi. Bu verilerden yola çıkarak,proje kapsamında Teucrium alyssifolium ekstresinden izole edilerek saflaştırılmış Alisin A, Alisin B, Sirsiliol ve Sirsilineol bileşiklerinin olası anti-diyabetik özellikleri in vitro hücre kültürü modellerinde araştırılması gerçekleştirildi.</p> <p>Proje kapsamında çalışılan bileşiklerden Sirsiliol ve Sirsilineol glikoz homeostazında rol oynayan hiçbir model mekanizma üzerinde anti-diabetik etki göstermemiştir. Bunun aksine, Alisin A ve Alisin B bileşikleri sitotoksik olmayan düşük dozlarda aşağıdaki etkileri saptandı</p> <ol style="list-style-type: none">1.T3-L1 adiposit, C2C12 ve Chang karaciğer hücrelerinde glikoz alınımını en az insülin etki düzeyinde olacak şekilde artırdı2.C2C12 ve Chang karaciğer hücrelerinde glikojen içeriğini insülin ve metforminden daha fazla olacak şekilde artırdı3.Caco-2 hücrelerinde AG (alfa-glikosidaz) ve GLUT2 ekspresyon düzeylerini baskıladı4.Caco-2 hücrelerinde SGLT1 ve GLUT1-5 ekspresyon düzeylerini baskıladı5.BTC6 pankreatik hücrelerinde IRS-1 ve GLUT2 ekspresyon düzeylerini indükledi6.3T3-L1 ve C2C12 hücrelerinde INSR, IRS- 2, PI3K, GLUT4, AKR, PK, G6P ekspresyon düzeylerini indükledi,7.Caco-2 hücreleri üzerinden glikoz transportunu artırdı8.BTC6 pankreatik hücrelerinde insülin salınımını etkilemedi <p>Bu veriler Alisin A ve Alisin B'nin glikoz homeostazında önemli rol oynayan model mekanizmalardan özellikle glikoz alınımlarını, kullanım ve depolanması mekanizmaları üzerinde anti-diyabetik şekilde çok önemli etki gösterdikleri tespit edildi. Ayrıca, bu iki bileşiğin glikoz metabolizmasında ve insülin sinyali yolağında rol oynayan anahtar genlerin ifade düzeylerinde de sonuç anti-diyabetik olacak şekilde değişiklikler yaptığı da saptandı. Alisin A ve B incelenen glikoz homeostazında önemli olan mekanizmaların hemen hepsinde pozitif veriler ortaya koyarak doğal ve pleotropik anti-diyabetik ajan oldukları yönünde önemli veriler üretildi. Bunu yanı sıra her iki bileşiğin düşük dozlarda bu etkileri gerçekleştirmeleri ve bu dozlarda kanser gibi bir diğer önemli bir patolojik durum için de koruyucu yan etkilere sahip olması bir diğer artı değer ve dikkat çekici durumdur.</p>
Anahtar Kelimeler:	Anti-diyabetik, Teucrium alyssifolium, Alisin A, Alisin B, Sirsiliol, Sirsilineol
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır