



## Streptozotosin Uygulanan İnsan Pankreatik $\beta$ Hücre Soy (1.1B4) Üzerine *Leontice leontopetalum* Ekstratının Antidiyabetik Etkisinin Araştırılması

Celal Güven<sup>1\*</sup>, Eylem Taşkın<sup>2,3\*</sup>, Önder Yumrutaş<sup>4</sup>, Leyla Türker Şener<sup>5</sup>, Fulya Dal<sup>6</sup>, Müfide Ahbab<sup>7</sup>, İbrahim Bozgeyik<sup>4</sup>, Işıl Albeniz<sup>5</sup>, Haydar Bağış<sup>8</sup>, Mustafa Pehlivan<sup>9</sup>, Fatih Üçkardeşler<sup>10</sup>, Handan Akçakaya<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik AD, 51240 Niğde, Türkiye

<sup>2</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, 51240 Niğde, Türkiye

<sup>3</sup>Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik AD, 01330 Adana, Türkiye

<sup>4</sup>Adıyaman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, 02200 Adıyaman, Türkiye

<sup>5</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik AD, 34093 İstanbul, Türkiye

<sup>6</sup>Haliç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik AD, 34445 İstanbul, Türkiye

<sup>7</sup>Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji AD, 06800 Ankara, Türkiye

<sup>8</sup>Adıyaman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, 02200 Adıyaman, Türkiye

<sup>9</sup>Gaziantep Üniversitesi, Nurdağı MYO, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ABD, 27840 Gaziantep, Türkiye

<sup>10</sup>Adıyaman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi ABD, 02200 Adıyaman, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

#### Araştırma Makalesi

Geliş 03 Nisan 2018

Kabul 09 Nisan 2018

#### Anahtar Kelimeler:

Diyabet

Bitkisel tedavi

Hücre canlılığı

İnsülin

*Leontice leontopetalum*

\*Sorumlu Yazar:

E-mail: cgven@yahoo.com

eylemtaskin@yahoo.com

### Ö Z E T

Yapılan araştırmalarda Berberidace familyasına ait bazı bitkilerin şeker hastaları tarafından kullanıldığı tespit edilmiştir. *Leontice leontopetalum* (LL), bu familyaya ait bir bitki türüdür. LL ekstratının, diyabet oluşturulmuş insan pankreatik  $\beta$  hücre soyu (1.1B4) üzerindeki antidiyabet etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Gereç ve Yöntemler: 10 ve 20 mM streptozotosin (STZ) uygulamalarıyla diyabet oluşturulan insan pankreatik beta hücrelere (1.1B4); 0, 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/ml dozlarındaki LL ekstratları 24 saat boyunca uygulanmıştır. Hücre canlılığı, gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi (xCelligence), glukoz (1,1, 8,4, 16,7 mM) ile indüklenmiş insülin salınım ve içeriği hücre soylarında belirlenmiştir. Bulgular: MTT analizi sonucunda, 1.1B4 hücreleri üzerinde 24 saatlik uygulamada tüm gruplarda LL ekstratın dozu arttıkça hücre canlılığında doza bağımlı azalma gözlenmiştir. Gerçek zamanlı hücre proliferasyonu analiz sonuçlarında hücre proliferasyonunun STZ dozuna bağımlı olarak azaldığı, *Leontice leontopetalum*'un en düşük ve yüksek dozlarında azalma olduğu, yine aynı şekilde STZ ile birlikte *Leontice leontopetalum* uygulanan tüm gruplarda da azalma tespit edilmiştir. Glukoz ile indüklenmiş insülin salınım sonuçlarında, STZ dozuna bağımlı olarak açlık ve en yüksek glukoz konsantrasyonlarında insülinin hücre içeriğinin azaldığı, STZ ile birlikte LL uygulamalarda doza bağımlı insülin içeriğinin azaldığı bulunmuştur. Sonuç olarak *Leontice leontopetalum* tedavisinin, diyabetik beta hücrelerde insülin içeriğini azaltması, insülinin salınımını arttırdığı; fakat hücre canlılığı üzerine olumsuz etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 6(6): 792-798, 2018

## The Investigation of Antidiabetic Effects of *Leontice leontopetalum* Extract on Human Pancreatic $\beta$ Cell Lines (1.1B4) Treated with Streptozotocin

### ARTICLE INFO

#### Research Article

Received 03 April 2018

Accepted 09 April 2018

#### Keywords:

Cell viability

Diabetes

Phytotherapy

Insulin

*Leontice leontopetalum*

\*Corresponding Author:

E-mail: cgven@yahoo.com

eylemtaskin@yahoo.com

### ABSTRACT

One of the alternative therapeutic methods is herbal medicine. *Leontice leontopetalum* belongs to Berberidaceae family. The aim of study was investigated the extract of LL on human pancreatic beta cell-treated with STZ. Materials and methods: The human pancreatic beta cell (1.1B4) line was used the current study. LL's extracts (1, 10, 100, and 1000  $\mu$ g/ml) were supplemented in media for twenty-four hours and/or after STZ treatment (10 and 20 mM). Cells survivals (MTT), cells proliferation were shown by using xCelligence. Insulin content and releasing were measured at 1.1, 8.4 and 16.7 mM glucose concentrations. Results: The result of MTT was shown that cell survival was decreased, based on dose-dependent. When looked at xCelligence results, cell proliferation in STZ groups and the lowest and highest concentrations of LL were attenuated in a dose-dependent manner. Also, cotreatments of LL and STZ were decreased as well. The result of insulin-releasing on glucose induction was shown that STZ concentration gave rise to reduce insulin content at low and high glucose levels. Also, co-treatment of LL and STZ attenuated insulin content based on dose. Conclusion: It was considered that LL treatment led to increased insulin realizing, resulting from decreasing insulin content in diabetic beta cells, but decrease cell survival.

## Giriş

Diyabet halk arasında şeker hastalığı olarak da bilinir. Bu hastalık ya insülin salgılamasında yetersizlik veya insülinin reseptörüne bağlanmasında bozulmalar sonucu ortaya çıkar. 2011 yılında diyabet, 346 milyondan fazla kişiyi etkilediği ve giderek daha fazla kişiyi etkileyeceği tahmin ediliyor (Vashum ve ark., 2014). Amerika Diyabet Cemiyeti verilerine göre 2007 yılında diyabetin ülke ekonomisine maliyeti 177 milyar dolar iken, 2012’de bu maliyet 245 milyar dolara ulaştığı rapor edilmektedir (American Diabetes, 2013).

Diabetes mellitus (DM) karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında oluşan bozukluklar ile ve çeşitli mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların aynı anda oluştuğu, kandaki glukoz derişimindeki artış ile belirlenen metabolik bir hastalıktır. Bütün DM hastalıkları, yetersiz oranda insülin desteğinden ya da insülinin sahip olduğu etkiyi yerine getirememesinden dolayı oluşan doku yanıtının yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (Alam ve ark., 2014; Kaya ve ark., 2018).

Diyabet genellikle Tip 1 Diyabet ve Tip 2 diyabet olarak iki tipe ayrılmaktadır. Tip 1 Diyabette, pankreas adacıklarında insülin üretiminde görev alan  $\beta$  hücrelerinin oto immune sisteminin yıkılımindan kaynaklanır. Tip 2 Diyabet, insülin direnci ve  $\beta$  hücre sistem işlevindeki bozukluklarının (disfonksiyon) kombinasyonu sonucu oluşan ilerleyici (progresif) bir hastalıktır (Dickson ve Rhodes, 2004).

Antik çağlardan beri, insanoğlu bitkileri koku, yakıt, silah olarak kullandığı gibi hastalıkların tedavisinde bitkileri ve özütlerini kullandıkları da bilinmektedir. Bununla birlikte, 1800’lü yıllarda, bitkilerden ilk aktif maddeler bitkilerden sentetik olarak elde edildi ve bunun sonucu olarak, ilaç endüstrisi doğdu ve eski geleneksel yöntemler bir kenara bırakılmaya başlandı. Bununla birlikte, özellikle son 30-35 yıl boyunca bitkisel özütlerin terapötik kullanımını içeren alternatif tıp olarak da bilinen geleneksel yöne doğru bir ilgi artışı ortaya çıktı. Çünkü modern tıpta kullanılan sentetik ilaçlar arzulan başarıyı elde etmede yetersiz kaldığı gibi birçok yan etkilerine karşın, sentetik ilaçların sadece bir pozitif yönün olması alternatif tıpa yönelmeyi doğurmuştur (Ertas ve ark., 2014). Tıp alanında kullanılan bitkiler doğrudan/dolaylı ilaç araştırmalarında kullanılırken bu araştırmalarda 800 tıbbi bitkinin tip-2 diyabette antidiyabetik olduğu belirtilmiştir. Tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin, pankreatik dokuda insülin duyarlılığını arttırmak ya da glukozun bağırsak emilimini inhibe etme yoluyla antidiyabetik etkilerini gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Gushiken ve ark., 2016; Ota ve Ulrich 2017). Ülkemiz, tıbbi tedavi amaçlı kullanılan bitki türleri açısından oldukça geniş ve büyük bir zenginliğe sahiptir. Ülkemiz de Güneydoğu Anadolu bölgesi floristik açıdan pek fazla araştırılmamış bölgelerinden bir tanesidir. Bu bölgede bulunan Berberidace familyasına ait olan *Leontice leontopetalum* L. subsp. *ewersmannii* (Bunge)’ de araştırılmayı bekleyen bitkilerden bir tanedir (Abdalla ve ark., 1989; Melikoglu ve ark., 2007).

Bitkinin akdenizin doğu kesimlerini sınırlayan İtalya, Yunanistan, Türkiye, Lübnan, Suriye, İsrail, Ürdün, ve İraktan Mısırın kuzey doğu bölgelerinde yetişir. Ayrıca Kıbrıs adasında yetiştiği bilinmektedir. Çok yıllık

bitkilerden olan LL, büyük bileşik yapraklı ve büyük ara katlı yumru, sarı çiçekli bir bitkidir. LL’nin sabun yapımında, afyon aşırıcı dozları için düzeltici olduğu ve yılan sokmalarına karşı kullanıldığı da rapor edilmiştir (Fish ve Nelson, 1956). LL halk arasında hemoroit otu, yer somunu (Korkmaz ve ark., 2014) ya da kırkbaş otu olarak da bilinir (Özgökçe ve Özçelik, 2004). LL’nin bağlı bulunduğu familyanın isokinolin ve kinolizidin alkaloidleri içerdiği bilinmektedir. İsookinolin ve kinolizidin alkaloidlerin bileşimi hakkında sınırlı bilgiler olmakla birlikte LL’ nin lupanin, 13 $\alpha$ -hidroksi lupanin,  $\alpha$ -isolupanin, 3 $\alpha$ -hidroksilupanin de biriktirdiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla, LL’nin lupanin tipdeki nolizidin alkaloidlerini topladığı bulunmuştur (Gresser ve ark., 1993). İlk olarak 1956 da LL’nin yumrularından elde edilen kuvaterner alkaloid petalin klorür grand mal epilepsinin tedavisinde kullanılmaya başlandı (Abdalla ve ark., 1989). Ayrıca LL’den elde edilen alkaloid ekstratının ve lupaninin yüksek bir antioksidan ve antikolinerjik özelliğinin olduğu bulunmuştur (Kolak ve ark., 2011). Dahası, LL’nin ülkemizde özellikle hemoroid tedavisinde sıklıkla kullanıldığına dair bilgiler de mevcuttur (Kolak ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulan İnsan pankreatik beta hücrelere (1.1B4) üzerindeki *Leontice leontopetalum*’ un antidiyabetik etkisini incelemeyi amaçladık.

## Materyal ve Yöntem

### *İnsan Pankreatik $\beta$ Hücre Kültürü*

İnsan pankreatik  $\beta$  hücre hattı (1.1B4, HPA Culture Collections, England) uygulamaya bağlı olarak çeşitli boylardaki hücre kültürü flasklarıyla, aseptik hücre kültüründe, %10 sıgır serum albumini, %1 purivat, 2mM glutamin ve antibiyotik (100 IU/ml penisilin, 0,1 mg/ml streptomisin) içeren RPMI 1640 besi yerinde, inkübasyon koşulları 37°C ve %5 karbondioksit olacak şekilde büyütüldü. Flasklardaki hücreler %80 oranında büyüdüklerinde çalışmaya başlandı.

### *$\beta$ Hücre Kültüründe Tip-1 Diyabet Modeli*

Tip-1 diyabet oluşturmak için deneylerde en yaygın olarak kullanılan streptozotosin (STZ) modeli kullanılacaktır. STZ’nin 15 mM’ in üzerindeki dozları pankreasın beta hücrelerinde apoptotik, 30 mM den daha yüksek STZ dozlarında ise nekroz yolakları üzerinden hücre ölümlerine neden olduğu rapor edilmiştir. STZ’nin 20 mM üzerindeki dozlarında insülinom, keratinositler ve genetiği değiştirilmiş karaciğer hücrelerinde oksidatif stres aracılığıyla apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Literatür taramalarında hücre kültüründe STZ 0-30 mM dozları arasında uygulanmıştır. STZ’ nin  $\beta$  hücrelerindeki sitotoksik etkisi iki saat içerisinde meydana gelmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda 10 ve 20 mM konsantrasyondaki STZ, 4 saat uygulandı. Böylece oluşturulan diyabetin şiddetinde değerlendirildi.  $\beta$  hücrelerindeki harabiyeti azaltmak ve insülin sekresyonunu arttırabilmek için besi yerine farklı konsantrasyondaki LL takviyesi STZ uygulamasının hemen ardından 24 saat yapıldı. Bu bilgilere dayanılarak

aşağıda gösterildiği gibi hipotezlerimizi test etmek amacıyla Tablo 1 de gösterilen deney grubu oluşturuldu.

#### *Leontice leontopetalum Ekstraktının Hazırlanması*

Toprak altından çıkartılan LL yumrusuna ait dış kabuk soyulduktan sonra içerideki etli kısım küçük parçalara bölünmüş ve karanlık ortamda kurutulmuştur. Elde edilen materyal laboratuvar tipi parçalayıcı ile toz haline getirilmiş daha sonra Soxhlet apartında 6 saat 55°C de etanol ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen etanol özütü 40°C yüksek vakum altında yoğunlaştırılmış ve +4°C deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır.

#### *Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi*

Hücre kültürleri 24 kuyucuklu plaklara %70-80 oranında çoğaldıklarında önce 4 saat süreyle STZ ile diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat boyunca bitki özütünün farklı dilüsyonları ile Tablo 1’de verilen konsantrasyonlarda inkübe edildi. Kontrol grubu ise normal besi yerinde inkübe edildi. Hücrelerin canlılığı MTT (3- [4,5- dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyl-tetrazoliumbromide) yöntemi ile değerlendirildi. Kültür vasatı 1 mg/ml MTT (Sigma) içeren SF vasatı ile değiştirilerek 37°C de 15 dk süre ile inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonu dökülecek ve hücrelerin üzerine dimetilsulfoksit (DMSO, Sigma) konuldu. Renkteki

değişim kolorometrik bir okuyucu ile (spektrofotometre) 550 nm’de okundu.

#### *Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi*

Uygulanan LL’lerin hücre proliferasyonu üzerine etkileri gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) kullanılarak yapıldı. Deneyler RTCA Xcelligence Roche cihazında uygulanarak 96’lık E-plate’lerde yapıldı. Optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra deneye başlandı. Hücreler 72 saat boyunca 15 şer dakika arayla elektrik impedansları ölçülerek sistemden izlendi.

#### *İnsülin Salınımının Belirlenmesi*

İnsülin salınımı standart ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Öncelikle insülin salınımının LL özütleri ile artıp artmadığını anlamak için hücrelere glukoz tolerans testi uygulandı. Bu test için ilk adım deney gruplarını yukarıdaki tabloda gösterildiği gibi oluşturuldu. İkinci adım ise, %0,5 fetal sığır serum albumini ve 1,1 mM glukoz içeren Krebs-Ringer/bikarbonat-HEPES tamponuyla 40 dakika inkübe edildi. Ardından, artan glukoz seviyelerinde (1,1 mM; 8,4 mM, 16,7 mM) her birinde 60 dakika boyunca maruz kaldı. Son işleme tabi olan hücrelerin içinde bulunduğu mediyum toplanarak, -80°C de insülin salınımları ölçülünceye kadar saklandı [31, 32]. Analizler Mikroquan Mikroplate Spektrofotometre ile yapıldı.

Tablo 1 Çalışmanın deney gruplarını oluşturmak için kullanılan kimyasallar ve dozları

Table 1 The utilization of chemicals and its doses to be carried out the experimental groups

Hücre Hattı	STZ (mM)	LL özütü (µg/ml)	Uygulama süresi
1.1B4	-	-	24
1.1B4	DMSO	-	24
1.1B4	-	1, 10, 100, 1000	24
1.1B4	10	-	24
1.1B4	10	1, 10, 100, 1000 µg/ml	24
1.1B4	20	-	24
1.1B4	20	1, 10, 100, 1000 µg/ml	24

## **Bulgular**

#### *Leontice leontopetalum Özütlerinin Hücre Canlılığına Etkisi*

Diyabet oluşturulan 1.1B4 hücreleri üzerine LL özütlerinin hücre canlılığına etkisi MTT testleri yapılarak analiz edildi. 24 saat süreyle tedavi edilen 1.1B4 hücrelerinin canlılıklarında LL’ in uygulanan dozunun artışına bağlı olarak azalma olduğu bulundu (Şekil 1-A). Diyabetin şiddetine bağlı olarak hücre canlılığındaki azalmanın daha belirgin olduğu tespit edildi. Aynı zamanda diyabet oluşturulan 1.1B4 hücrelerine LL özütü tedavisinin yine kullanılan konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bulundu (Şekil 1-B ve C).

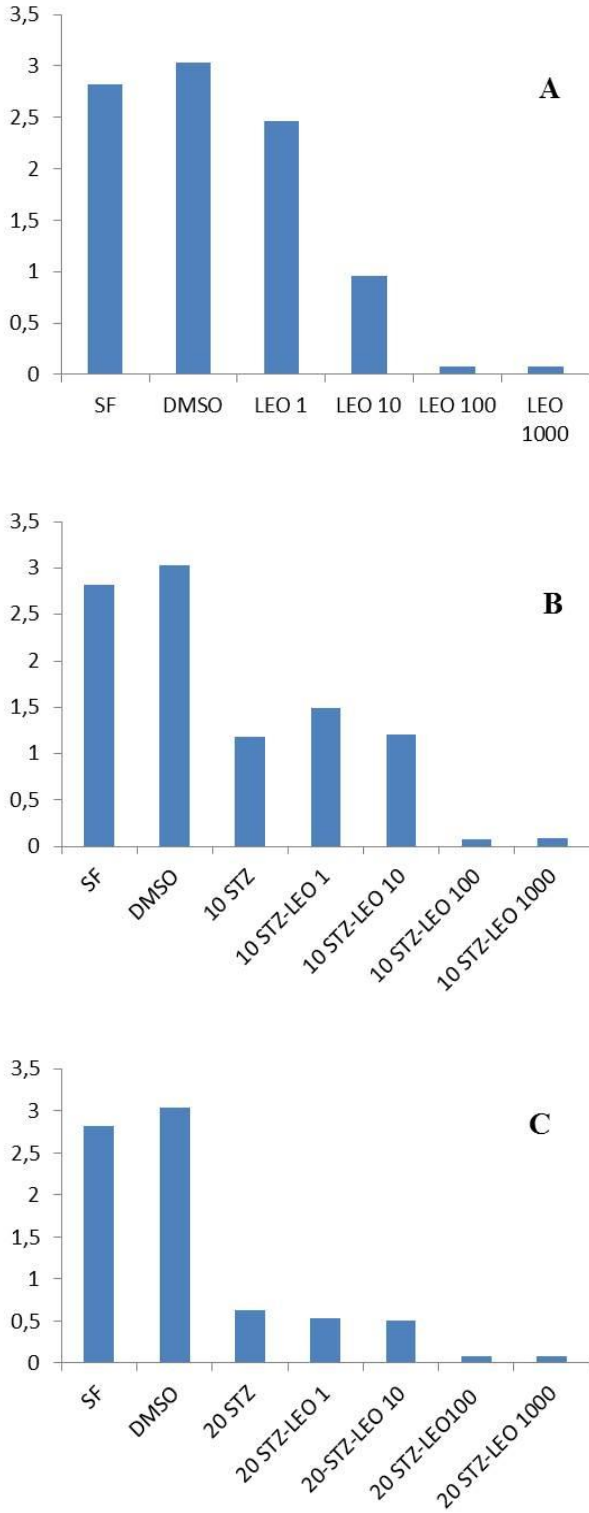
#### *Leontice leontopetalum Özütlerinin Hücre Proliferasyonuna Etkisi*

LL özütü tedavisinin hücre siklusu üzerindeki etkileri gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) kullanılarak 72 saat boyunca her 15 dakikada bir ölçüm alınarak analiz edildi. 10 mM STZ kullanılarak diyabet oluşturulan gruba ait hücre proliferasyonunun kontrol grubu değerleriyle aynı olduğu bulundu. LL’ nin 1 ve 1000 µg/ml dozlardaki

tedavisine ait hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre % 85-95 oranında azalırken, diyabetin şiddetinden bağımsız olarak 1.1B4 hücrelerine uygulanan LL’in kullanılan dozlarında kontrol gruplarına göre %85-100 oranlarında hücre proliferasyonunda azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

#### *Leontice leontopetalum Özütlerinin İnsülin Salınımına Etkisi*

Antidiyabetik etkinin en önemli belirteçlerinden olan insülin salınımına etkisi de araştırılmıştır. Bu amaç için açlık (1,1 mM glukoz), normal (8,4 mM glukoz) ve hiperglisemik (1,1 mM glukoz) koşullar altında insülin salınım analizleri yapılmıştır. Diyabet beklenildiği gibi insülin salınım miktarında tüm glukoz dozlarında önemli bir azalmaya neden oldu. Yine benzer şekilde sadece LL özütü uygulanan ve diyabet oluşturulduktan sonra LL özütü tedavisi uygulanan tüm grupların glukoz dozlarının hepsinde insülin salınım miktarını istatistiksel önemde azalttığı bulundu. Hatta, bu azalma diyabetin şiddetinin artmasıyla daha da arttı (Şekil 3).



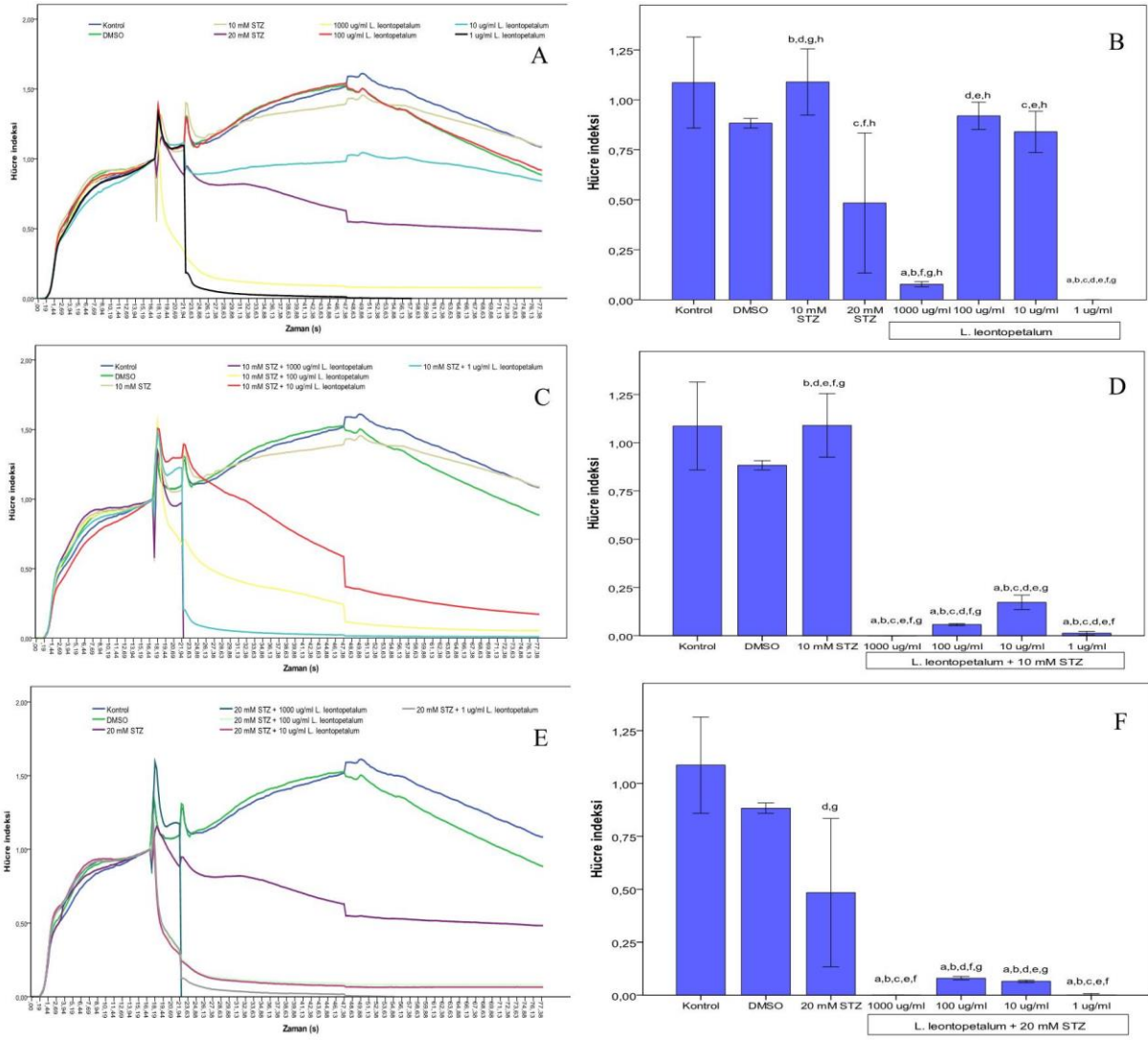
Şekil 1 A, B, C Farklı konsantrasyonlarda *L. leontopetalum* ve STZ ile muamele edilen 1.1B4 pankreatik beta hücrelerinin 24 saat sonra MTT ile ölçülen hücre hücre canlılığı  
 Figure 1 A, B, C cell viability in Pancreatic beta cells 1.1B4 treated with different *L. leontopetalum* concentrations and STZ by measured of MTT after 24 hours

## Tartışma

Diabetes mellitus, insülin salınımı ve/veya insülinin çevredeki hücreleri etkilemesi sonucu meydana gelen bozukluklar sonucunda kan şekerindeki artışı ile karakterize olan metabolik bir sendromdur (Lopez Lopez ve ark., 2017; Zoffmann ve Kirkevold, 2005). Bu hastalık yaygın ve komplikasyonludur. Diyabete bağlı yüksek kan şekerinin düşürülebilmesi, hastalığa bağlı gelişen komplikasyonları önemli derecede azaltabilir. Hipergliseminin tamponlana bilmesi için genellikle insülin kullanılmaktadır (American Diabetes, 2009). Fakat, diyabetik tedavi istenilen düzeyde değildir ve bu da bitkisel tedaviye yönelimin artmasına neden olmuştur (Kotha ve ark., 2017).

Deney hayvanlarında ve hücre kültüründe deneysel diyabet oluşturulması kimyasal ajanlar (Dunn ve ark., 1944) ile kendiliğinden (Chang ve Perry, 1978) ya da virüs aracılığıyla (Ejrnaes ve ark., 2006) yapılabilmektedir. Deneysel diyabetin oluşturulmasında alloxan ve Streptozotosin (STZ) kullanılan önemli kimyasal ajanlardır. STZ onkojenik, onkolitik ve diyabetojenik özelliği olan dar spektrumlu bir antibiyotiktir (Herr ve ark., 1959). STZ diyabetojenik etkisini, pankreastaki  $\beta$  hücrelerini hasar vererek gösterir. Hipergliseminin derecesiyle süresi, ilacın süresi dozuna, deney hayvanının veya hücre soyunun direncine bağlıdır (Imaeda ve ark., 2002; Tozzo ve ark., 1997). STZ'nin 15 mM'ın üzerindeki dozları pankreas beta hücrelerin ölümünü ile apoptozu indükler, ardında takiben STZ'nin 30 mM dan daha yüksek dozlarda nekrozu indüklemektedir (Saini ve ark., 1996). STZ'in 20 mM üzerindeki dozlar diğer hücre sistemlerde sadece apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur (Harel ve ark., 2002). İnsülin salgılayan hücreleri insülinom, keratinositler ve genetik olarak hepatositleri kullanılarak yapılan çalışmalar da STZ'nin 20 mM üzerindeki dozlarda oksidatif stres ve apoptozu neden olduğunu göstermiştir (Harel ve ark., 2002). STZ serbest alkilleyici radikallerin oluşmasını sağladığından, DNA fragmantasyonu, nukleotidlerin ve bileşenlerinin özellikle nikotinamid adenin dinukleotidin oksitlenmiş formunun hücre içi seviyelerinin azalmasına ve böylece ani hücre nekrozuna sebep olmaktadır (Takada ve ark., 2007). Dolayısıyla çalışmamızda diyabetin şiddetinin de etkisini araştırmak için 10 ve 20 mM konsantrasyonlardaki STZ kullanıldı.

HepG2 hücrelerine uygulanan STZ'in hem doza hem de zamana göre etkileri MTT testi ile hücre canlılıkları incelenmiş ve 48 saat uygulana 20 mM STZ'nin hücrelerin önemli bir bölümünü öldüğü aynı zamanda 10 mM STZ uygulamasının da hücrelerin %40'ını öldüğü belirtilmektedir (Raza ve John 2012). Benzer şekilde yapılan bu çalışmada da STZ'in her iki dozu pankreatik  $\beta$  hücre kayıplarına neden olduğu ve ne yazık ki LL özütü tedavisinin bu kayıpları önleyemediğini bulduk. Hatta, LL tedavisi hücre ölümlerinde belirgin bir atışa da neden olmaktadır. Dolayısıyla, bu etkilere dayanılarak LL özütünün  $\beta$  hücreler üzerine toksit bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 2 A, C ve E: Hücrelerin 72 saat farklı konsantrasyonlarda *L. leontopetalum* ve STZ ile muamele edildikten sonra xCelligence kaydedilen hücre proliferasyon eğrileri. B, D ve F: xCelligence ile izlenen hücrelerin hücre indeksleri. Gruplar arasındaki farklılık  $P < 0,05$ 'dir.

Figure 2 A, C and E: The cell proliferation was recorded by xCelligence after cells were treated with different *L. leontopetalum* and STZ concentrations for 72 hours. B, D ve F: Cell indices of cells were monitored by xCelligence.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant

Hücre proliferasyon analizinin MTT sonuçlarını destekler nitelikte olduğu bulunmuştur. STZ uygulamasının hücre çoğalmasımı (proliferasyonunu) azalttığını ve LL özüt terapisinin bu azalmayı şiddetlendirdiği kanısına varılmıştır.

İnsülin sentezinde ve salgılanmasında en önemli düzenleyicisi plazma glukozudur (Moonschi ve ark., 2017; Oh ve Jun 2017; Pathak ve ark., 2014). Dolayısıyla, insülin duyarlılığının azalması glukoz düzeyinde bozulmalara sebep olmaktadır (Bulduk ve ark., 2012). Memeli beta hücrelerinin temel işlevi vücuttaki tüm dokulara yanıt olarak plazmadaki glukozun yeterli insülinin salınımıdır (Ishihara ve ark., 2003). Yapılan çalışmada pankreatik  $\beta$ -hücrelerin insülin salınımını analiz etmek için glukoz testi yapıldı ve LL özütü tedavisi yapılan tüm dokularda arttırdı. Bu artışın LL özütünün asetilkolin benzeri etkisiyle ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu öngörümüz yapılan bir çalışmaya dayanmaktadır. Bu çalışmada, izole aorta preparatlarında düşük doz petalin klorürün orta düzeyde vazodilatasyon

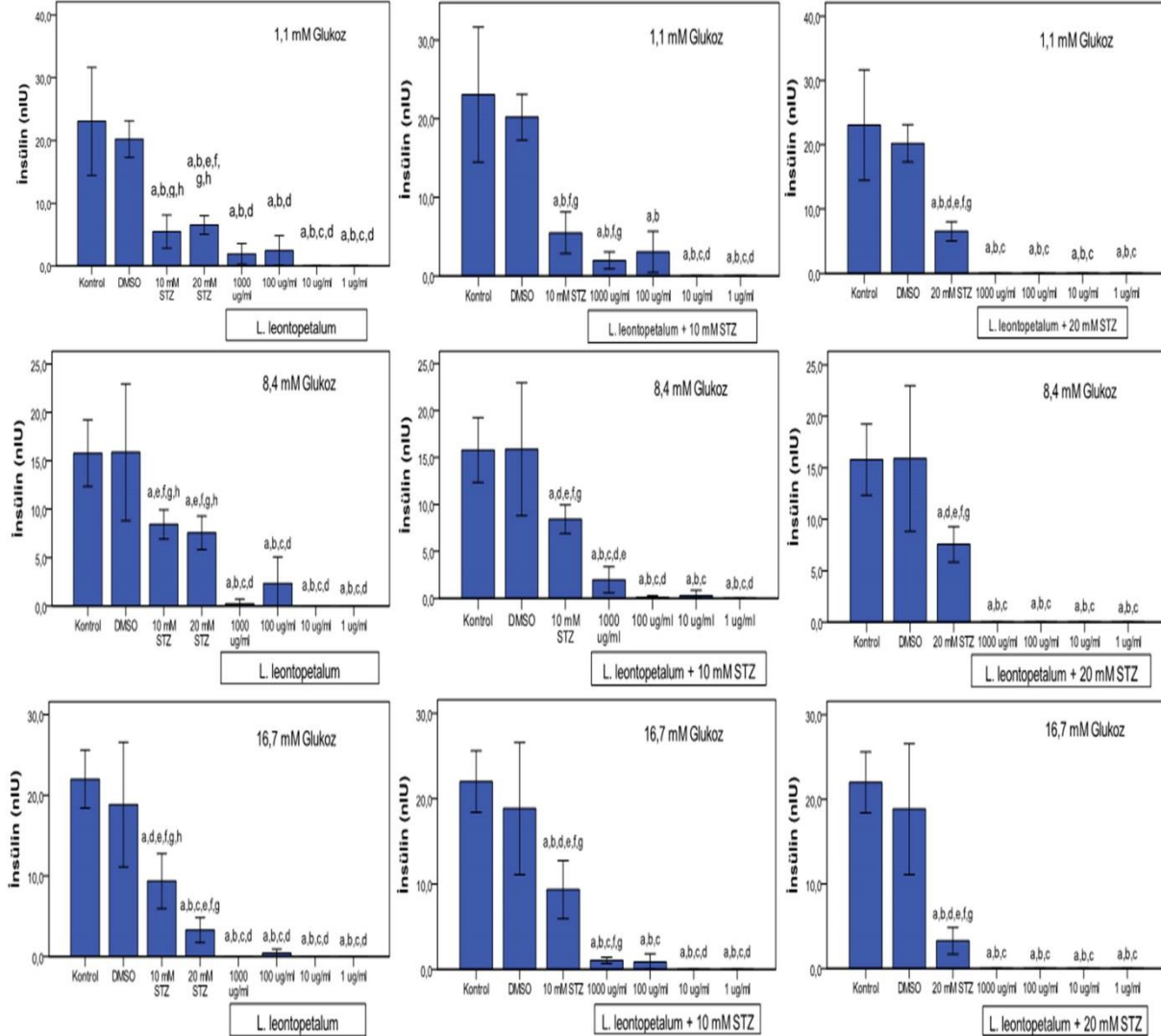
yapmasına rağmen asıl etkilerinin aorta, trakea ve ileum'da kontraksiyona neden olmasıdır (Abdalla ve ark., 1989). Yine benzer sonuçlar başka bir çalışmada da rapor edilmektedir. Bu çalışmada ise, düşük doz petalin klorür, epinefrin ile kastırılmış aortada gevşeme, ileumda kasılma yaptığı bildirilmektedir (Gulcin ve ark., 2006). Trakea ve ileumdaki kasılma, aortada ve diğer damarlarda gevşemenin ardından kasılmaya yol açtığı için asetilkolin benzeri maddeleri oluşumuna aracılık edebileceği ve böylece muskarinik reseptörlerinin uyarıma neden olarak bu etkilerin ortaya çıkmasına sebep olabileceği öne sürülmüştür (Abdalla ve ark., 1989). Dahası asetilkolinin M3 ve M5 reseptörlerine bağlanarak  $\beta$  hücrelerden insülin salınımını arttırdığı iyi bilinmektedir (Molina ve ark., 2014). Ayrıca izole kalp ile yapılan bir çalışmada ise, petalin klorürün kalp atım hızının artışına neden olduğu bildirilmektedir. Benzer şekilde atrium kasının kasılmasını arttırdığını ve bu olayda kalsiyum bağımlı olduğu sonucuna varılmıştır. Kasılma artışını, petalin klorür araşidonik asit metabolizması aracılığıyla ya



inotropik metaboliklerin artışına ya da inhibitör inotropik metaboliklerin azalmasıyla yapabileceği önerilmektedir. Araşidonik asit metabolitlerinden olan prostaglandinlerin pozitif inotropik etkileri ve bunlardan prostaglandin E1' in siklik AMP miktarının artışına neden olduğu bildirilmektedir (Abdalla ve ark., 1989). Petalinklorid' in düşük dozlarda solunumu yavaşlattığı ve sedanter

etkilere, yüksek dozlarda solunumu durdurduğu ve merkezi sinir sistemini uyardığı da bildirilmektedir (Ahmad ve Lewis 1960).

Sonuç olarak, *Leontice leontopetalum* tedavisininin, diyabetik beta hücrelerde insülin içeriğini azaltması, insülinin salınımını arttırdığı; fakat hücre canlılığı üzerine olumsuz etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 3 Grupların insülin hücre içerikleri. Gruplar arasında farklılık  $P<0,05$ ' dir  
Figure 3 Insulin cell contents of groups.  $P<0.05$  was considered to be statistically significant.

## Teşekkür

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir (TIPFBAP/2014-0006).

## Kaynaklar

- Abdalla S, Abu-Zarga M, Sabri S.1989. Preliminary observations on the pharmacology of petaline chloride, a quaternary alkaloid from *Leontice leontopetalum*. *Gen Pharmacol* 20(5):565-9
- Ahmad K, Lewis JJ. 1960. On the pharmacology of petaline chloride, a convulsant alkaloid from *Leontice leontopetalum* Linn. *J Pharm Pharmacol* 12:163-74

- Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. 2014. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol* 126:211-22 doi:10.1016/B978-0-444-53480-4.00015-1
- American Diabetes A. 2009. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 Suppl 1:S62-7 doi:10.2337/dc09-S062
- American Diabetes A. 2013. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care* 36(4):1033-46 doi:10.2337/dc12-2625
- Buldak L, Dulawa-Buldak A, Labuzek K, Okopien B. 2012. Effects of 90-day hypolipidemic treatment on insulin resistance, adipokines and proinflammatory cytokines in patients with mixed hyperlipidemia and impaired fasting glucose. *Int J Clin Pharmacol Ther* 50(11):805-13 doi:10.5414/CP201735

- Chang AY, Perry CS. 1978. Acid glycohydrolase in Chinese hamster with spontaneous diabetes. IV. Diabetes- and line-dependent variation in plasma enzyme activity. *Diabetologia* 15(5):423-9
- Dickson LM, Rhodes CJ. 2004. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(2):E192-8 doi:10.1152/ajpendo.00031.2004
- Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, Kirkpatrick J, McLetchie NG. 1944. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. *J Physiol* 103(2):233-43
- Ejrnaes M, von Herrath MG, Christen U. 2006. Cure of chronic viral infection and virus-induced type 1 diabetes by neutralizing antibodies. *Clin Dev Immunol* 13(2-4):337-47 doi:10.1080/17402520600800721
- Fish F, Nelson PF. 1956. Studies on *Leontice leontopetalum* Linn. II. History, sources and macroscopical characters of the plant *L. leontopetalum*. *J Pharm Pharmacol* 8(12):1134-42
- Gulcin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. 2006. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine* 13(5):343-51 doi:10.1016/j.phymed.2005.03.009
- Gushiken LF, Beserra FP, Rozza AL, Bergamo PL, Bergamo DA, Pellizzon CH. 2016. Chemical and Biological Aspects of Extracts from Medicinal Plants with Antidiabetic Effects. *Rev Diabet Stud* 13(2-3):96-112 doi:10.1900/RDS.2016.13.96
- Guven C, Dal F, Aydogan Ahabab M, et al. 2016. Low dose monoethyl phthalate (MEP) exposure triggers proliferation by activating PDX-1 at 1.1B4 human pancreatic beta cells. *Food Chem Toxicol* 93:41-50 doi:10.1016/j.fct.2016.04.023
- Harel A, Bloch O, Vardi P, Bloch K. 2002. Sensitivity of HaCat keratinocytes to diabetogenic toxins. *Biochem Pharmacol* 63(2):171-8
- Herr RR, Eble TE, Bergy ME, Jahnke HK. 1959. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot Annu* 7:236-40
- Imaeda A, Kaneko T, Aoki T, et al. 2002. Antioxidative effects of fluvastatin and its metabolites against DNA damage in streptozotocin-treated mice. *Food Chem Toxicol* 40(10):1415-22
- Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL, Wollheim CB. 2003. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* 5(4):330-5 doi:10.1038/ncb951
- Kaya ST, Bozdogan O, Ozarslan TO, et al. 2018. The protection of resveratrol and its combination with glibenclamide, but not berberine on the diabetic hearts against reperfusion-induced arrhythmias: the role of myocardial KATP channel. *Arch Physiol Biochem*:1-8 doi:10.1080/13813455.2018.1440409
- Kocahan S, Dogan Z, Erdemli E, Taskin E. 2017. Protective Effect of Quercetin Against Oxidative Stress-induced Toxicity Associated With Doxorubicin and Cyclophosphamide in Rat Kidney and Liver Tissue. *Iran J Kidney Dis* 11(2):124-131
- Kotha P, Badri KR, Nagalapuram R, Allagadda R, Chippada AR. 2017. Anti-Diabetic Potential of the Leaves of *Anisomeles malabarica* in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem* 43(4):1689-1702 doi:10.1159/000484030
- Lopez Lopez R, Fuentes Garcia R, Gonzalez-Villalpando ME, Gonzalez-Villalpando C. 2017. Diabetic by HbA1c, Normal by OGTT: A Frequent Finding in the Mexico City Diabetes Study. *J Endocr Soc* 1(10):1247-1258 doi:10.1210/js.2017-00266
- Melikoglu G, Cubukcu B, Sariyar G. 2007. Flavonoids of *Artemisia araratica*. *Nat Prod Res* 21(8):767-8 doi:10.1080/14786410601130646
- Molina J, Rodriguez-Diaz R, Fachado A, Jacques-Silva MC, Berggren PO, Caicedo A. 2014. Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes* 63(8):2714-26 doi:10.2337/db13-1371
- Moonschi FH, Hughes CB, Mussman GM, Fowlkes JL, Richards CI, Popescu I. 2017. Advances in micro- and nanotechnologies for the GLP-1-based therapy and imaging of pancreatic beta-cells. *Acta Diabetol* doi:10.1007/s00592-017-1086-7
- Oh YS, Jun HS. 2017. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. *Int J Mol Sci* 19(1) doi:10.3390/ijms19010026
- Ota A, Ulrich NP. 2017. An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes. *Front Pharmacol* 8:436 doi:10.3389/fphar.2017.00436
- Ozaykan B, Taskin E, Magemizoglu A. 2017 Effect of salt loading on baroreflex sensitivity in reduced renal mass hypertension. *Clin Exp Hypertens* 39(7):592-600 doi:10.1080/10641963.2017.1299748
- Pathak V, Vasu S, Flatt PR, Irwin N. 2014. Effects of chronic exposure of clonal beta-cells to elevated glucose and free fatty acids on incretin receptor gene expression and secretory responses to GIP and GLP-1. *Diabetes Obes Metab* 16(4):357-65 doi:10.1111/dom.12227
- Raza H, John A. 2012. Streptozotocin-induced cytotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Mol Sci* 13(5):5751-67 doi:10.3390/ijms13055751
- Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron DP. 1996. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem Mol Biol Int* 39(6):1229-36
- Takada J, Machado MA, Peres SB, et al. 2007. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* 56(7):977-84 doi:10.1016/j.metabol.2006.05.021
- Taskin E, Guven C, Sahin L, Dursun N. 2016. The Cooperative Effect of Local Angiotensin-II in Liver with Adriamycin Hepatotoxicity on Mitochondria. *Med Sci Monit* 22:1013-21
- Taskin E, Tuncer KA, Guven C, Kaya ST, Dursun N. 2016. Inhibition of Angiotensin-II Production Increases Susceptibility to Acute Ischemia/Reperfusion Arrhythmia. *Med Sci Monit* 22:4587-4595
- Tozzo E, Gnudi L, Kahn BB. 1997 Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter. *Endocrinology* 138(4):1604-11 doi:10.1210/endo.138.4.5043
- Vashum KP, McEvoy M, Milton AH, Islam MR, Hancock S, Attia J. 2014. Is serum zinc associated with pancreatic beta cell function and insulin sensitivity in pre-diabetic and normal individuals? Findings from the Hunter Community Study. *PLoS One* 9(1):e83944 doi:10.1371/journal.pone.0083944
- Zoffmann V, Kirkevoold M. 2005. Life versus disease in difficult diabetes care: conflicting perspectives disempower patients and professionals in problem solving. *Qual Health Res* 15(6):750-65 doi:10.1177/1049732304273888