



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KASİDE (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) BİTKİSİ
ETANOLİK EKSTRESİNİN LC-MS/MS İLE İÇERİK ANALİZİNİN
BELİRLENMESİ VE DİYABETİK SIÇANLARDA EKSTRENİN
İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Salih BAKAÇ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN
II. DANIŞMAN: Doç. Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KASİDE (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) BİTKİSİ
ETANOLİK EKSTRESİNİN LC-MS/MS İLE İÇERİK ANALİZİNİN
BELİRLENMESİ VE DİYABETİK SIÇANLARDA EKSTRENİN
İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Salih BAKAÇ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN
II. DANIŞMAN: Doç. Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ

VAN-2022

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2022-9948 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“Kaside (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) bitkisi etanolik ekstresinin LC-MS/MS ile içerik analizinin belirlenmesi ve diyabetik sıçanlarda ekstrenin iyileştirici etkilerinin araştırılması”** başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mehmet Salih BAKAÇ

Tarih: 27/12/2022

İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, her zaman yanımda olan bilimsel olarak beni yönlendiren çok kıymetli tez danışmanım sayın Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN'a, ikinci tez danışmanım olmayı kabul eden Doç. Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ'a ve laboratuvar çalışmalarımda sürekli yanımda olan Araş. Gör. Fatih DÖNMEZ hocama, Yüksek lisans arkadaşlarım Zeynep KARAKUŞ ve Hamza Can OLCAY'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Yüksek lisans eğitimim süresince ders aldığım ve bana bilgilerini paylaşan değerli hocalarıma, Eczacılık Fakültesinin Değerli akademik ve idari çalışanlarına, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama merkez müdürü çalışanlarına, bitki teşhisinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin EROĞLU'na ve çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli eşim Medine BAKAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

BAKAÇ M.S, Kaside (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) Bitkisi Etanolik Ekstresinin LC-MS/MS ile İçerik Analizinin Belirlenmesi ve Diyabetik Sıçanlarda Ekstrenin İyileştirici Etkilerinin Araştırılması, Van Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Eczacılık Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2022. Lamiaceae familyasında yer alan Kaside (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) bitkisi antikanser, antihemolitik, antiproliferatif, antioksidan, antimikrobiyal etkilere ve *in vitro* diyabetik enzim inhibisyon aktivitesine sahiptir. Bu çalışmada, *Scutellaria orientalis* (SO) etanol ekstresinin LC-MS/MS ile fenolik içeriğinin belirlenmesi ve ekstrenin streptozotosin (STZ) 50 mg/kg ile diyabet oluşturulan ratlarda iyileştirici etkileri biyokimyasal, antioksidan ve antidiyabetik bulgular ışığında ortaya konulması amaçlandı. Toksikite testi sonrası kırk iki adet rat rastgele altı eşit gruba (n=7) ayrıldı. Kontrol grubu, Diabetes mellitus (DM) grubu, SO ile tedavi edilen DM'li gruplar (100 mg/kg, 200 mg/kg ve 400 mg/kg) ve DM + Gly (Glibenklamit)-3 mg/kg grubu. Yirmi bir günlük uygulama sonrasında; SO ekstresinin antidiyabetik ve antioksidan rolünün belirlenebilmesi için; serum biyokimyasal parametrelerden alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), kolesterol, trigliserid (TG), yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL_c), kreatinin, üre, glukoz ve total kanda glikolize hemoglobin (HbA_{1c}) ölçüldü. Ayrıca karaciğer, böbrek ve pankreas dokularında malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) içerikleri, antioksidan savunma unsurlarından glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon reduktaz (GR), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen bulgulara göre, SO ekstresinde total fenolik içeriği (61.34±3.29 mg GAE/g), total flavonoit içeriği (48.60±2.68 mg RE/g), LC-MS/MS içerik analizinde ise major bileşiklerden apigenin (1.653 µg/g), luteolin (0.932 µg/g), kinik asit (0.701 µg/g), kozmosiin (0.656 µg/g) ve epigallokateşin (0.625 µg/g) tespit edildi. Özellikle SO-400 mg/kg ekstre ve Gly-3 gruplarının genel olarak ALT, LDH, kolesterol, üre, glikoz ve HbA_{1c} seviyelerinde azalmaya sebep oldu. Ayrıca SO tedavisi ile karaciğer, böbrek ve pankreas dokularında MDA düşerken GSH düzeyinde ise artışa neden olduğu belirlendi. DM grubu antioksidan enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre negatif olarak etkilendi. Diğer yandan, tedavi gruplarında antioksidan enzim aktivitelerinin ise kontrol değerlerine çekildiği görüldü. İlaveten, SO ile tedavi diyabetik rat gruplarının karaciğer dokusunda GR artışına ve pakreas dokusunda ise GST, CAT ve SOD enzim aktivite artışına neden oldu. Sonuç olarak, SO bitki ekstresi sahip olduğu zengin fitokimyasal içerik nedeniyle antioksidan ve antidiyabetik potansiyele sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Diyabet, LC-MS/MS, *Scutellaria orientalis*, Rat.

ABSTRACT

BAKAÇ M.S, Determination of Content Analysis of Scullcap (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) Plant Ethanolic Extract by LC-MS/MS and Investigation of the Therapeutic Effects of the Extract in Diabetic Rats, Van Y.Y.Ü. Institute of Health Sciences, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Biochemistry Science, Master Thesis, Van, 2022. Scullcap (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) plant, which belongs to the Lamiaceae family, has anticancer, antihemolytic, antiproliferative, antioxidant, antibacterial effects and *in vitro* diabetes enzyme inhibitory activity. The aim of this study was to determine the phenolic content *Scutellaria orientalis* (SO) ethanol extract by LC-MS/MS and to investigate its therapeutic effects on streptozotocin (STZ) (50 mg/kg) induced diabetic rats in the light of the biochemical, antioxidant, and antidiabetic findings. After the toxicity test, forty-two rats were randomly divided into six equal groups (n=7): control group, diabetes mellitus (DM) group, DM groups treated with SO (100 mg/kg, 200 mg/kg, and 400 mg/kg), and the DM + Gly (Glybenclamide)-(3 mg/kg) group. After twenty-one days of treatment, alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), cholesterol, triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL c), creatinine, urea, glucose, and total blood glycosylated hemoglobin (HbA1c) were measured among the serum biochemical parameters. Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels in the tissues of the liver, kidney, and pancreas were also evaluated, as well as the activities of the antioxidant defense enzymes glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx). According to the findings, total phenolic content (61.34 ± 3.29 mg GAE/g) and total flavonoid content (48.60 ± 2.68 mg RE/g) measured and apigenin ($1.653 \mu\text{g/g}$), luteolin ($0.932 \mu\text{g/g}$), quinic acid ($0.701 \mu\text{g/g}$), cosmosin ($0.656 \mu\text{g/g}$) and epigallocatechin ($0.625 \mu\text{g/g}$) were identified as major compounds according to LC-MS/MS analysis. There was a general decrease in the levels of ALT, LDH, cholesterol, urea, glucose and HbA1c, especially in the SO-400 mg/kg extract and Gly-3 groups. Also, while SO treatment caused reduction in MDA levels in the liver, kidney, and pancreas tissues, it caused increase in GSH levels. The antioxidant enzyme activities of the DM group were negatively affected when compared to the control group. On the other hand, the antioxidant enzyme activities of the treatment groups regulated to control values. Furthermore, treatment with SO resulted with increase in GR in liver tissue and increase in GST, CAT, and SOD enzyme activities in pancreatic tissue of SO-treated diabetic rat groups. As a result, SO plant extract may have antioxidant and anti-diabetic properties due to its high phytochemical content.

Key Words: Antioxidant, Diabetes, LC-MS/MS, *Scutellaria orientalis*, Rat.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
TABLolar LİSTESİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.2. Diabetes Mellitus ve Serbest Radikaller	4
2.3. Diabetes Mellitus ve Antioksidanlar.....	5
2.4. Oral Antidiyabetikler ve Glibenklamid	7
2.5. Çalışmada Kullanılan Analitik Teknikler	10
2.5.1. LC-MS teknikleri	10
2.5.2. LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi)	11
2.6. Scutellaria	12
2.6.1. <i>Scutellaria orientalis</i> L. Subsp. <i>pichleri</i>	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Gereç	16
3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	16
3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler	16
3.1.3. Bitki	16
3.1.4. Deney hayvanı (Sıçan).....	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Etanolik liyofilize ekstrenin hazırlanması	17
3.2.2. Toplam fenolik miktar tayini	17
3.2. 3. Toplam flavonoit miktar tayini	18

3.2.4. LC-MS/MS analizi.....	19
3.2.5. Toksisite testi ve dozların belirlenmesi	20
3.2.6. Streptozotosinle (STZ) sıçanlarda diyabet oluşturulması	20
3.2.7. Deneysel muamele ve grupların oluşturulması.....	21
3.2.8. Kan ve doku örneklerinin alınması.....	21
3.2.9. Doku homojenizasyonu	22
3.2.10. Total protein tayini.....	22
3.2.11. Rutin serum biyokimyasal ve HbA1c analizleri.....	23
3.2.12. Malondialdehit tayini.....	24
3.2.13. Redükte glutatyon tayini.....	25
3.2.14. Glutatyon S-transferaz enzim tayini	26
3.2.15. Glutatyon redüktaz enzim tayini.....	27
3.2.16. Katalaz enzim tayini	28
3.2.17. Glutatyon peroksidaz tayini.....	30
3.2.18. Süperoksit dismutaz tayini.....	31
3.2.19. İstatistiksel analizler	31
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	55
EKLER.....	56
EK 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kesin Sonuç Raporu	56
Ek 2. Tez Orijinallik Raporu.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Absorbans
%	: Yüzde
ΔOD	: Zamana göre absorbans değişimi
μL	: Mikrolitre
ADA	: Amerikan diyabet derneği
ALT	: Alanin aminotransferaz
APG	: Açlık plazma glukozu
AST	: Aspartat aminotransferaz
BSA	: Sığır serum albümini
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CHA	: Canlı hayvan ağırlıkları
dL	: Desilitre
DM	: Diabetes mellitus
DTNB	: 5-5'-ditiobis 2- nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FeSO₄	: Demir II sülfat
g	: Gram
GLP	: Glukagon benzeri peptit
GLUT	: Glukoz taşıyıcıları
Gly	: Glibenklamid
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon s-transferaz
H⁺	: Hidrojen
H₂O	: Su

H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Glikozillenmiş hemoglobin
HCl	: Hidroklorik asit
HDL_c	: Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol
HO[•]	: Hidroksil
HOO[•]	: Hidroperoksil
HPO₃	: Metafosforik asit
IDF	: Uluslararası diyabet federasyonu
i.p.	: İntraperitoneal
kDa	: Kilo dalton
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LDL_c	: Düşük dansiteli lipoprotein kolesterol
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
mol/L	: Mol
MS	: Kütle spektrometre
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NADP⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaH₂PO₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
nmol	: Nano mol

NO[•]	: Nitrik oksit
O₂	: Moleküler oksijen
O₂^{•-}	: Süperoksit
°C	: Santigrat derece
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
OS	: Oksidatif stres
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
RNS	: Reaktif azot türleri
ROO[•]	: Peroksil radikali
ROOH	: Organik hidroperoksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SO	: <i>Scutellaria orientalis</i>
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOE	: <i>Scutellaria orientalis</i> ekstresi
STZ	: Streptozotosin
T1DM	: Tip 1 diabetes mellitus
T2DM	: Tip 2 diabetes mellitus
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TC	: Total kolesterol
TCA	: Trikloro asetik asit
TG	: Trigliserit
Tris	: Hidroksi metil amino metan
U	: Ünite
UV/VIS	: Ultraviyole/görünür ışık
Vö	: Örnek hacim
Vt	: Toplam hacim
WHO	: Dünya sağlık örgütü
ΔA	: Absorbans değişimi
μM	: Mikromolar
μmol	: Mikromol

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Serbest radikallerin biyolojik hedefleri.....	4
Şekil 2.	Antioksidan enzim mekanizmaları.....	6
Şekil 3.	Kütle spektrometre cihazların şematik diyagramı.....	11
Şekil 4.	Tekli kuadrupol (LC-MS) ve üçlü kuadrupol (LC-MS/MS) cihaz şemaları.....	12
Şekil 5.	Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi.....	18
Şekil 6.	Toplam flavonoit madde tayininde standart olarak kullanılan kersetinin kalibrasyon eğrisi.....	19
Şekil 7.	Protein standart eğrisi.....	23
Şekil 8.	MDA standart eğrisi.....	24
Şekil 9.	GSH standart eğrisi.....	26
Şekil 10.	GPx standart eğrisi.....	30
Şekil 11.	SOD standart eğrisi.....	31
Şekil 12.	<i>S. oerientalis</i> etanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramı.....	34
Şekil 13.	Haftalık canlı hayvan ağırlık değişimi.....	35
Şekil 14.	Haftalık kan glukoz değişimi.....	35
Şekil 15.	Deneyisel gruplara ait biyokimyasal parametre düzeyleri.....	36
Şekil 16.	Deneyisel gruplara ait HbA1c düzeyleri	37

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	MDA yöntemi.....	25
Tablo 2.	GSH yöntemi.....	26
Tablo 3.	Karışımların küvete alınması ile GST ölçümünün yapılması.....	27
Tablo 4.	GR.karışımların küvete alınması ile ölçümün yapılması.....	28
Tablo 5.	Katalaz fosfat tamponun hazırlanışı.....	29
Tablo 6.	Katalaz fosfat tampon solüsyonların karıştırılarak hazırlanması.....	29
Tablo 7.	Katalaz tampon ve örneklerin küvete pipetlenmesi.....	29
Tablo 8.	<i>S. orientalis</i> bitkisinin total fenolik ve flavonoit içerikleri.....	33
Tablo 9.	<i>S. orientalis</i> etanolik ekstresinin LC-MS/MS (mg analit/g ekstre) ile fitokimyasal içeriğin nicel olarak belirlenmesi.....	33
Tablo 10.	<i>S. orientalis</i> bitki ekstresinin çeşitli dokulardaki MDA, GSH içerikleri ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi.....	40

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM) önemli metabolik bozukluklardan biridir. Diyabet prevalansı ve tedavisi için yapılan harcamalar yıldan yıla artmaktadır. Sun ve ark. (2022) yaptıkları çalışmaya göre, yetişkinlerde diyabetin küresel prevalansı 2021'de %10,5 (536,6 milyon kişi) olduğu ve 2045'te bu sayının %12,2'ye (783,2 milyon) yükseleceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, küresel diyabetle ilgili sağlık harcamalarının 2021'de 966 milyar ABD doları olduğu ve 2045 yılına kadar bu maliyetin 1054 milyar dolar olacağını bildirmişler. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre ölümlerin başlıca nedenlerden biri DM ve DM ile ilişkili komplikasyonların sebep olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde sağlık bakanlığı tarafından 2018 yılında açıklanan bir rapora göre Türkiye'de 7 milyon DM'li hastanın olduğu ve görülme sıklığı bakımından Ekonomik Kalkınma ve İş birliği Örgütü (OECD) ülkeleri arasında ikinci sırada yer aldığımız belirtilmektedir (Özlüer Başer ve ark., 2021). İlaç endüstrisindeki son gelişmelere rağmen, insanlar diyabetle mücadelede alternatif yaklaşımlara ilgi duymaktadır. Diyabet hastaları günlük yaşamlarını iyileştirmek için şifalı bitkilere, bunların özlerine ve bunlardan izole edilmiş aktif bileşiklere alternatif bir tedavi yöntemi olarak geçmişte olduğu gibi günümüzde de ilgi göstermektedir. Bu nedenle etnofarmakolojik açıdan önemli bitkilerin antidiyabetik ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması son zamanlarda önem kazanmıştır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyada tıbbi amaçlı kullanılan 21.000 bitkiden 400'den fazlasının diyabet ve diyabetin komplikasyonlarını engellemede tedavi amaçlı kullanıldığı rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2021). Avrupa, Kuzey Amerika, Doğu Asya ve Güney Amerika'da yaygın yayılımı olan *Scutellaria* cinsi Lamiaceae familyasında yer alır ve yaklaşık 360-469 tür ile temsil edilmektedir (Shen ve ark., 2021). *Scutellaria* cinsinin flavonoid, diterpenoid ve triterpenoid bileşikler bakımından zengin olduğu rapor edilmiştir (Shang ve ark., 2010). Biyolojik olarak aktif zengin fitokimyasal içeriğine sahip *Scutellaria* cinsine ait türlerin kanser, karaciğer, gastrik bozukluklar, solunum, nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklar ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde etkilidir (Shen ve ark., 2021).

Halk arasında Kaside olarak bilinen *Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri* türünün toprak üstü ve çiçek kısımlarının Türkiye halk hekimliğinde analjezik, antikanser ve antihemoroid tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Mükemre ve ark., 2015; Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2009). *S. orientalis*'in yüksek flavon ve total fenolik içeriğine ve *in vitro* antidiyabetik enzim inhibisyon özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Zengin ve ark., 2019). *S. orientalis* ekstresinin yüksek fenolik içeriğe ve antioksidan potansiyele sahip olduğu bilinmekle birlikte, bitkinin *in vivo* etkileri belirsizliğini koruyor.

Bu çalışmada, *S. orientalis* etanolik liyofilize ekstresinin LC-MS/MS ile fenolik içeriğinin belirlenmesi ve ekstrenin streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda iyileştirici etkileri biyokimyasal, antioksidan ve antidiyabetik bulgular ışığında ortaya konulması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

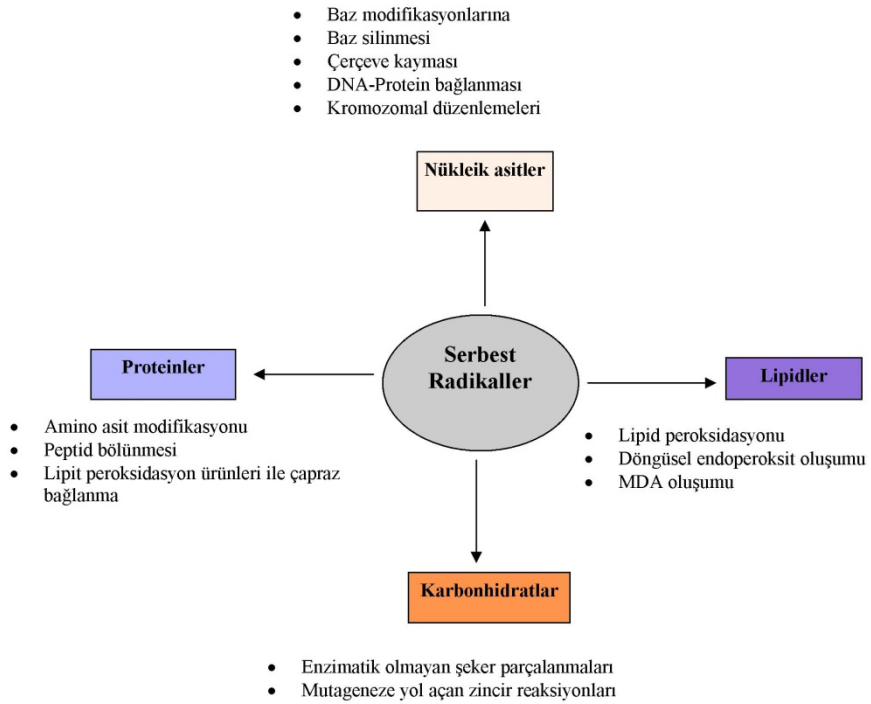
Diabetes mellitus (DM), pankreas bezinin langerhans adacıklarındaki β -hücrelerinden insülin salınımının yetersizliği veya yokluğuna bağlı olarak dolaşımdaki açlık kan glukoz düzeyinin düzeyinin ≥ 126 mg/dL olması ile karakterize endokrinolojik bir bozukluktur (Agirman ve ark., 2022). DM'nin ilerlemesinde karbonhidrat, protein ve yağ metabolizma bozukluklarının da eşlik ettiği komplike bir durumdur. DM oluşmasında beslenme biçimi, sedanter yaşam tarzı, çevresel toksinler, stres, uykusuzluk ve genetik faktörlerin rolü olduğu bilinmektedir.

Dünyada artan nüfus, gıdaya ulaşımında yaşanan sıkıntılar ve dengesiz beslenmeye bağlı olarak çeşitli hastalıklar oluşmaktadır. Kasım 2021 verilerine göre dünya nüfusunun (7,9 milyar) yaklaşık %14,7'si (537 milyon) diyabet hastasıdır. Ayrıca yetişkin diyabetik hastalara yönelik sağlık harcamalarının yılda en az 966 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (Sun ve ark., 2022). Tip 1, Tip 2, gestasyonel ve diğer nedenlerden kaynaklanan spesifik diyabet türleri olmak üzere 4 çeşit diyabet türü vardır. Ancak, diyabetin etiyolojik sınıflandırması, prensip olarak tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki ana tipe ayırır ve toplam DM prevalansının çoğunu (>%85) tip 2 diyabet oluşturur (Forouhi ve Wareham, 2019). Tip 1 diyabet genellikle 20 yaş altı bireylerde görülen, β -hücrelerinin immun bir atak sonucu yok edildiği, insülin sentezinin düşük veya olmadığı, genetik yatkınlık, adacık hücre antikorların ve ketoasidozisin olduğu, obezitenin yaygın olmadığı ve insülin ile tedavi edilen bulaşıcı olmayan bir hastalıktır (Baynes ve Dominiczak, 2009). Tip 2 diyabet ise genellikle 40'lı yaşlarda ortaya çıkan, insülin salınımı ve plazma insülin konsantrasyonunun düşük olduğu, insülin direnci, genetik yatkınlık ve obezitenin yaygın olduğu, ketoasidozun nadir ancak büyük metabolik stres ile gelişebildiği, oral antidiyabetik ilaçlar ve insülin ile tedavi edilebildiği bulaşıcı olmayan bir hastalıktır (Baynes ve Dominiczak, 2009). Tip 1 ve Tip 2 diyabet retinopati, nefropati ve nöropati dahil olmak üzere mikrovasküler uç noktalarda ve iskemik kalp hastalığı, inme ve periferik vasküler hastalıklar makrovasküler uç noktalarda çoklu sistem komplikasyonlarına yol açabilmektedir (Forouhi ve Wareham, 2019). Diyabet tanısı açlık kan glukozu ($126 \geq$ mg/dL), %

glükolize hemoglobin ($HbA_{1C} \geq \% 6.5$), oral glukoz tolerans testi (OGTT) ve herhangi bir zamanda ölçülen kan glukoz değerinin $200 \geq \text{mg/dL}$ üzerinde çıkan kriterlere göre belirlenmektedir (WHO, 2006). Bu dört kriterden bir tanesi bile var ise kişi diyabet hastası olarak kabul edilir.

2.2. Diabetes Mellitus ve Serbest Radikaller

Serbest radikaller oksijen, nitrojen ve kükürtten türetilir. Oksijen merkezli serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($HO^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) ve nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) içerir. $HO^{\cdot}$ ve $RO^{\cdot}$ serbest radikaller çok reaktiftir ve yakındaki hücrelere hızla saldırarak onarımı zor süreçlere sebep olurlar (Gulcin, 2020). Serbest radikaller özellikle lipitlere, karbonhidratlara, proteinlere ve nükleik asitlere saldırarak olumsuz etkilere sebep olurlar (Şekil 1).



Şekil 1. Serbest radikallerin biyolojik hedefleri

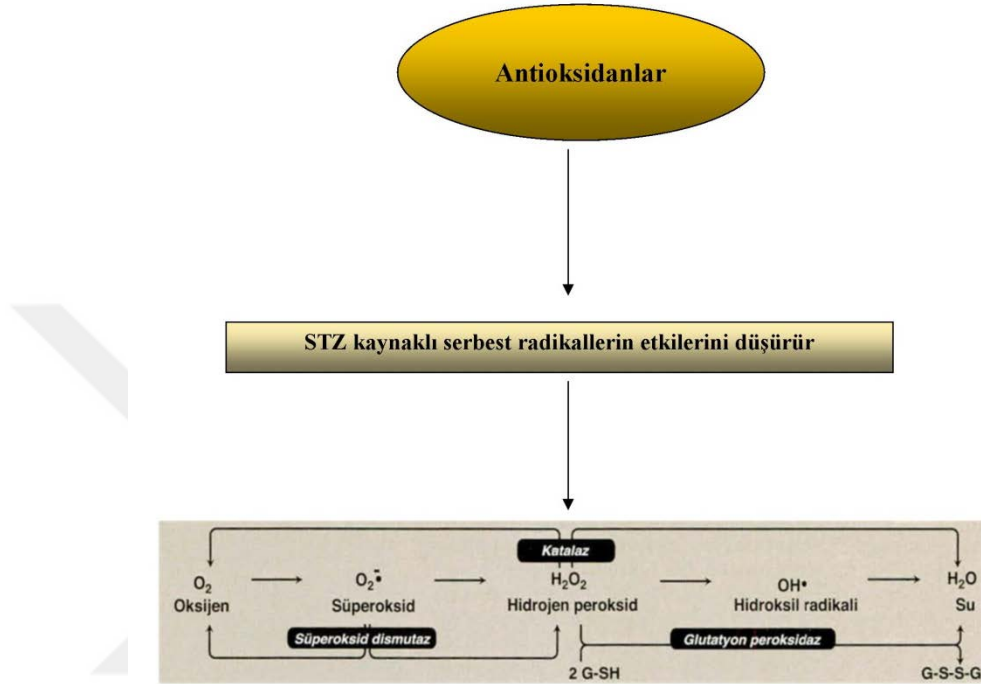
ROS ve antioksidanlar arasındaki herhangi bir dengesizlik, oksidatif stres (OS) olarak bilinen ve aralarında diyabetin de bulunduğu patolojik durumun gelişmesine

neden olan bir duruma yol açar (Asmat ve ark., 2016). Diabetes Mellitus'un ortaya çıkması ve gelişmesinde OS rolü kritik öneme sahiptir. Glikolitik, heksosamin, protein kinaz C, poliol ve ileri glikasyon son ürünü moleküllerin farklı metabolik yollarda pro-oksidatif süreçlerde diyabetin düzenlenmesinde rolü vardır (Ighodaro, 2018). Deneysel kanıtlar, tip 1 diyabette otoimmün reaksiyonlar, sitokinler ve enflamatuar proteinlerin neden olduğu bozulmuş beta hücre fonksiyonunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) rolünün olduğu vurgulanmıştır (Prattichizzo ve ark., 2018). Klinik çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, OS Tip 2 diyabetin prevalansı ve pro-oksidan seviyeleri ve oksidatif stres kaynaklı doku hasarı biyobelirteçleri (DNA bazlarının oksidasyonu, 4-hidroksi-2- gibi) ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Rehman ve Akash, 2017; Aouacheri ve ark., 2015). ROS'daki artış OS gelişmesinde önemli rol oynayan eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. OS diyabet ve diyabetle ilişkili komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesinde anahtar rolü olduğu gösterilmiştir (Rains ve Jain, 2011). Diyabet patogeneğinde OS'nin enzimatik sistemlerdeki değişiklik, lipid peroksidasyonu, bozulmuş glutatyon metabolizması ve azalmış C vitamini, glutatyon, katalaz ve süperoksit dismutaz seviyeleri üzerinde etkisi olduğu belirtilmiştir (Asmat ve ark., 2016). OS ile gelişen makro ve mikrovasküler komplikasyonlar, diyabetik hastalarda morbidite ve mortalitenin önde gelen nedeni olmakla beraber bu komplikasyonlar dokuya özgüdür ve benzer mekanizmalardan kaynaklanır (Ahmad ve ark., 2005). Ayrıca DM, koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık ve serebrovasküler hastalık gibi makrovasküler komplikasyonlara ve retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonların gelişimine katkıda bulunur (Sun ve ark., 2021; Papatheodorou ve ark., 2016).

2.3. Diabetes Mellitus ve Antioksidanlar

ROS'ların etkilerini çeşitli mekanizmalarla ortadan kaldıran veya hafifleten yapılara antioksidanlar denir. Antioksidanlar, ROS'un oksidatif süreçlerini ve zararlı etkilerini azaltmak için hem gıda sistemlerinde hem de insan vücudunda hayati rollere sahiptirler (Göçer ve ark., 2013). Enzimatik ve enzimatik olmayan pekçok antioksidan madde bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) önemli enzimatik antioksidanlardan bazılarıdır. Bu antioksidanlar çeşitli mekanizmalarla

serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırır veya hafifletirler. Ayrıca enzimatik olmayan antioksidanlarda sentetik ve doğal antioksidanlar olarak gruplandırılırlar. Antioksidanlar Şekil 2’de gösterildiği gibi serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırır.



Şekil 2. Antioksidan enzim mekanizmaları

Sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanlarla karşılaştırmak ve gıdaya dahil edilmek üzere standart bir antioksidan aktivite ölçüm sistemine sahip olacak şekilde geliştirilmiştir (Gulcin, 2020). Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), tert-bütillhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) ve oktil galat (OG) önemli sentetik antioksidanlardır (Gülcin, 2012). Sentetik antioksidanlar toksikolojik etkileri açısından kapsamlı bir şekilde test edilmesine rağmen insanların doğal antioksidan maddelere olan ilgisi güncelliğini sürekli koruduğuna inanılmaktadır.

Doğal gıda katkı maddelerinin artan popülaritesi, daha fazla gıda üreticisini sentetik antioksidanları doğal antioksidan bileşikler içeren bileşenlerle değiştirmeye sevk etmektedir (Gulcin, 2020). Çünkü doğal ürünlerinin ROS'a ve serbest radikallerin neden olduğu çeşitli hastalıklara karşı koruma sağladığına ve sentetik antioksidanlara

oranla yan etkilerinin daha az olduğuna inanılmaktadır. Fenolik bileşikler, fenolik asitler, flavonoidler, flavonoller, karotenoitler, likopen, β -kriptoksantin, retinol (A Vitamini), tokoferoller (E vitamini), troloks, askorbik asit (C Vitamini), stilbenler, resveratrol, kumarinler, liganlar, tanenler, tannik asit ve çeşitli mineraller önemli doğal antioksidanlardan bazılarıdır.

Antioksidanlar, diyabet tedavilerinde yararlı bileşikler olarak kabul edilir. Bu nedenle, antioksidan özelliklere sahip bitkisel ilaçlar, diyabet tedavisinde önemli rol oynayabilir (Xie ve ark., 2009). Kronik diyabet, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak ve/veya antioksidan savunma sistemi aktivitesini azaltarak oksidatif stresin oluşumunu kolaylaştırır. Meyvelerde ve bitkilerde birçok fitokimyasal vardır ve her biri farklı şekilde diyabet kaynaklı hasarın önlenmesinde rol alırlar. Bitkilerin antihiperglisemik aktivitesi, esas olarak, insülin çıkışında bir artışa neden olarak veya glikozun bağırsak emilimini inhibe ederek veya insüline bağımlı süreçlerde metabolitlerin kolaylaştırılmasını sağlayarak pankreas dokularının işlevini eski haline getirme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Mohan ve ark., 2013). Polifenollerin antidiyabetik etkileri insülin uyarması, insülin sekresyonu, insülin duyarlılığı, glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) salgısı ve GLP-1 yarı ömrü uyarırken hiperglisemiye ve dipeptidil peptidaz-4'ü (DPP-4) baskılar (Neha ve ark., 2019). Ayrıca, STZ ile diyabet oluşturulan rat modellerinde STZ'nin glukoz, HbA1c, AST, ALT, LDH, kreatinin, üre, MDA, LDL_c, düzeylerinde artışa neden olduğu belirlenirken; insülin, C-peptid, SOD, GPx, CAT, GST, GR ve GSH düzeylerinde ise düşüşe neden olduğu belirlenmiştir (Dogan ve ark., 2015; Doğan ve Çelik, 2016; Duman ve ark., 2022).

2.4. Oral Antidiyabetikler ve Glibenklamid

Diyabetik hastaların klinik tablosuna göre farklı tedavi yaklaşımları bulunmaktadır. Bu tedavi yaklaşımlarından bazıları beslenme, hareket, etnofarmakolojik açıdan yararlı bitkisel ürünlerin kullanımı ve ilaç tedavileridir. Prediyabet, insülin salınımının yetersiz olduğu ve kan glukoz düzeyinin normal sınırların üzerinde ise oral antidiyabetik kullanımı önerilmektedir. Diyabet tedavisinde kullanılan başlıca oral antidiyabetik ilaç sınıfları biguanidler, sülfonilüreler, meglitinid, tiyazolidinedion (TZD), dipeptidil peptidaz 4 (DPP-4) inhibitörleri, sodyum-glikoz kotransporter (SGLT2) inhibitörleri ve α -glukozidaz inhibitörleri bulunur (Chaudhury ve ark., 2017).

Oral antidiyabetik ilaçlar, monoterapi veya kombinasyon halinde tip 2 diyabet tedavisinin temelini oluşturur (Bron ve ark., 2012). Oral antidiyabetik ilaçların tedavide kullanımının ortak özelliği, tedavinin düşük dozda başlatılması ve hastada ölçülen HbA1c ve kan glukoz düzeyindeki glisemik cevaba göre yeri geldiğinde titre edilerek takibin yapılmasıdır (Krentz ve Bailey, 2005).

Biguanidler, özellikle diyet ve egzersiz tedavisinin başarısız olduğu obez hastalarda, insülin direncinin üstesinden gelmek için hafif ila orta dereceli tip 2 diyabetli hastalarının tedavisinde kullanılan oral ajanlardır (Mehanna, 2013). Biguanidlerin iki yönlü bir etki mekanizması vardır: (1) kas ve yağ hücrelerini mevcut insüline karşı daha duyarlı hale getirerek periferik kas glukoz alımını ve kullanımını arttırmaları ve (2) karaciğerin aşırı glikoz yapmasını önleyerek hepatik glikoz çıkışını inhibe ederler (Miller ve ark., 2013; Singh, 2016). Biguanid ilaçların ana etkisi, karaciğer mitokondrisinde adenosin-5'-monofosfatla aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu yoluyla ortaya çıkmasıdır (Zhou ve ark., 2011). Biguanidler sınıfın en önemli ilaçlarından biri Metformindir. Metformin, tip 2 diyabetin tedavisi için WHO tarafından en yaygın şekilde reçete edilen temel ilaç olarak kabul edilir. Metforminin glukoz metabolizması üzerinde pleotropik etkileri olduğu gösterilmiş olsa da, tip 2 diyabetli hastalarda başlıca glukoz düşürücü etkinin çoğunlukla hepatik glukoneogenezin inhibisyonu aracılığıyla olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır (LaMoia ve Shulman, 2021).

Sülfonilüreler, bir fenil-sülfonil-üre yapısı içeren en eski oral antidiyabetik ilaç sınıfıdır. Sülfonilüreler, pankreas beta hücrelerinde ATP'ye duyarlı potasyum kanallarına (K^+) bağlanır ve onları inhibe ederek, K^+ akışı azalır ve beta hücre zarı depolarize olur. Membran depolarizasyonu, kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarının açılmasına neden olarak Ca^{+2} akışına ve hücre içi Ca^{+2} 'un artmasına neden olarak pankreatik beta hücrelerinden kan glukoz seviyelerinden bağımsız olarak insülin salınımına neden olur (Proks ve ark., 2002).

Sülfonilüreler sınıfının 2. kuşak ilaçlarından glibenklamit önemli bir oral antidiyabetik ajandır. Glibenklamid, merkezi sinir sistemi hasarını takiben sülfonilüre reseptörü 1'i (Sur1) ve K_{ATP} kanalının düzenleyici alt birimini inhibe ederek aşırı

inflatuar yanıtı azaltan tip 2 diaybetin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır (Caffes ve ark., 2015).

Meglitinidler, yarı ömrü kısa etkili anti-diyabetik ajanlardır ve bu nedenle postprandiyal hiperglisemi düşürmede ve hipoglisemi tehlikesini azaltmada değerli rollere sahiptirler (Wu ve ark., 2017). Bu sınıfta en çok kullanılan ilaçlar repaglinid ve nateglinid'dir. Her iki ilaç da karaciğerde metabolize edilir ve repaglinid'in < % 10'u ve nateglinidin çoğu renal olarak atılır (Snyder ve Berns, 2004).

Tiyazolidinedionlar (TZD), insülin duyarlılığını artırarak tip 2 diyabetli hastalarda metabolik kontrolü iyileştiren bir oral antidiyabetik ilaç sınıfıdır. TZD'ler, antidiyabetik etkilerini, bir nükleer reseptör olan peroksizom proliferatörle aktive olan reseptörün (PPAR γ) gama izoformunun aktivasyonunu içeren bir mekanizma yoluyla gösterir (Hauner, 2002).

Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri, tip 2 diyabet tedavisi için kullanılan bir ilaç sınıfıdır. Bu sınıftaki ilaçlar şiddetli hipoglisemiye neden olmadan metabolik kontrolü sağlayarak iyileştirme sağlaması beklenmektedir (Richter ve ark., 2008).

Sodyum-glikoz kotransporter (SGLT2) inhibitörleri böbrekte glukozun yeniden emilmesinde rol oynayarak SGLT2 inhibitörleri renal glukoz atılımını artırır ve sonuç olarak plazma glukoz seviyelerini düşürürler (Isaji, 2007). SGLT2, yüksek kapasiteli/düşük afiniteli bir Na⁺/K⁺ yardımcı taşıyıcısı olup, glukozun %90'nın yeniden emilmesinden sorumludur (Madaan ve ark., 2016).

α -glukozidaz inhibitörleri, karbonhidrat emilimini geciktirerek, HbA1c'de önemli bir düşüşle postprandial hiperglisemi ve postprandiyal insülinde önemli bir azalma sağlayan oral antidiyabetik ajanlardır (Rabasa-Lhoret ve Chiasson, 2003). α -glukozidaz inhibitörleri ince bağırsağın epitelinde bulunan zara bağlı bir enzimdir ve oligosakkaritlerin emilebilir monosakkaritlere hidrolitik bölünmesini katalize ederek glukozun ince bağırsak tarafından emilmesini kolaylaştırmaya çalışır (Kumar ve ark., 2011).

2.5. Çalışmada Kullanılan Analitik Teknikler

İnsanlık geçmişi boyunca, bitkilerden elde edilen ürünlerin hastalıkların tedavisinde iyileştirici etkileri, besin ve gıda amacıyla kullanılmışlardır. Bu anlamda güvenilir kaynaklar olan tıbbi bitkiler, ilaç keşif hedefleri doğrultusunda bileşikler bulmak için araştırılacak yüzlerce molekül içerdikleri görülmüştür. (McChesney ve ark., 2007; Huang ve ark., 2004).

Kromatografi, karışımlardaki bileşenleri basit veya karmaşık yöntemlerle birbirinden ayırmak için kullanılan analitik bir tekniktir. Genel olarak tanımlamak gerekirse kromatografi, madde karışımlarının (nukleik asit, polisakkarit, protein ve enzim v.b) sabit ve mobil faz arasında ayırtırmak istenen bileşenin sabit bir faza eklenmesi ve bu sabit faz üzerinde akan bir başka hareketli bir faz sayesinde bileşenlerine ayrılması ilkesine dayanan çok yönlü ve analitik güce sahip bir kromatografik tekniktir. Bir kromatografi sisteminde: (i) sabit, (ii) hareketli ve (iii) ayırtırmak istenen karışım olmak üzere 3 bileşen bulunmaktadır. Karışımdaki maddeler sabit ve mobil faz arasında, yük, şekil, büyüklük ve çözünürlük gibi özelliklerinden yararlanılarak ayırtırma işlemi gerçekleştirilmektedir. Çeşitli kaynaklardaki maddeleri ayırmak için ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, kapiler elektroforez ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Sherma 2010; Ganzera 2008; Gotti 2011).

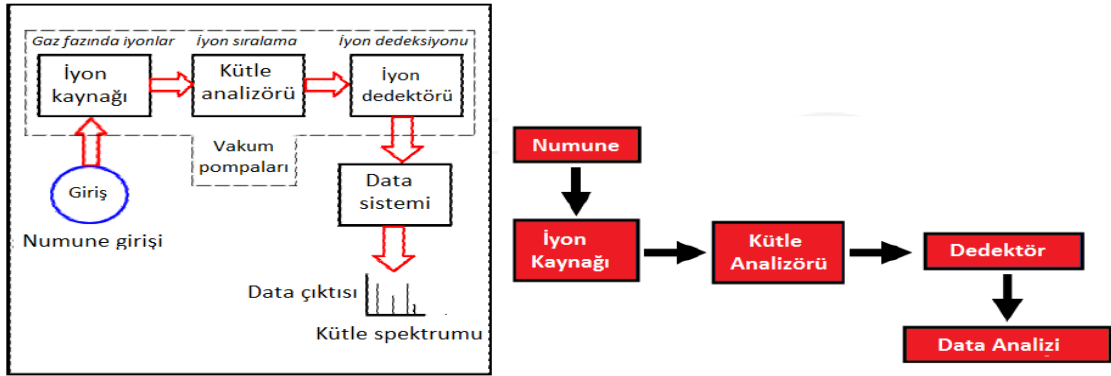
2.5.1. LC-MS teknikleri

Kütle spektrometresi (MS), kimyasal türleri iyonize eden ve oluşan iyonları kütle/yük oranını esas alarak oluşturulan ve daha çok kalitatif amaçlar için kullanılan bir analitik tekniktir. MS dedektörleri özellikle bilinmeyen maddelerin doğrulanmasında geniş ölçekli kullanılır (Watson ve Sparkman 2007; Chiu ve Muddiman 2008).

Kütle spektrometresi dedektörleri (Şekil 3) elektrik ya da manyetik kuvvet alanlarını kullanarak iyonları kütle (m)/yük(z) oranlarına göre ayıran optik cihazlardır. Kütle spektrometre cihazı; numuneden iyonları oluşturarak, iyonları m/z oranlarına göre ayırtırmak ve iyonların fazlalığını ölçmeye dayalı bir tekniktir. Kütle spektrometre

dedektörleri nötr moleküllerin kütesini doğrudan ölçmediği için molekülü iyonlaştırarak (m/z) oranını ölçerler.

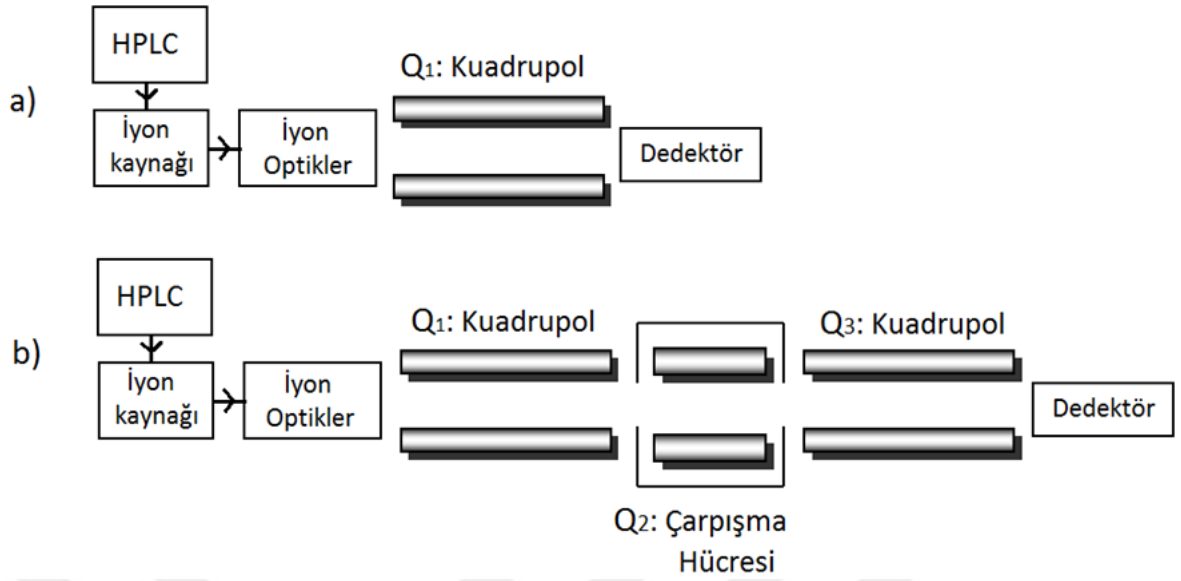
Bir kütle spektrometresi üç parçadan oluşur: Bir iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektörden oluşur. Kütle spektrometre tekniği canlı matrislerdeki (insan, bitki, hayvan vs.) dokusu veya herhangi bir canlı matriste bulunan dokuların sekonder metabolitleri hem kalitatif (nitel) hem de kantitatif (nicel) analizlerini yapmak amacıyla kullanılabilir.



Şekil 3. Kütle spektrometre cihazlarının şematik diyagramı

2.5.2. LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi)

Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ile birleşen (tekli kuadrupol) ve özellikle de (üçlü kuadrupol) cihaz sistemleri (Şekil 4) organik bileşiklerde olduğu gibi bitkilerin sekonder metabolitlerinin kalitatif (nitel) ve kantitatif (nicel) analizlerinde çok sık tercih edilmektedir. LC-MS cihazı ile HPLC kolonunda belli bir ayırmadan geçen analitlerin ana iyon (parent iyon) da denilen moleküler iyonlarını belirleyerek bileşenlerin nicel (kantitatif) veya nitel (kalitatif) analizleri yapılır. Aynı kütle/yük oranına sahip birçok sayıda molekül olmasına rağmen doğada aynı parçalanma iyonlarına sahip moleküllerin bulunma olasılığı 1/100000 dir. Bunun için LC-MS/MS tekniği spesifik bir testtir. Bundan dolayı bu teknikle çok küçük derişimlerde kantitatif analiz yüksek duyarlılıkla yapılmaktadır. LC-MS/MS tekniği örneğinde bulunan bileşenlerin miktarını, molekül ağırlığını ve molekül yapısını kısa sürede tayin edebilir (Vogeser ve Kirchhoff, 2011).



Şekil 4. Tekli kuadrupol (LC-MS) ve üçlü kuadrupol (LC-MS/MS) cihaz şemaları

2.6. Scutellaria

Lamiaceae familyasında yer alan *Scutellaria* cinsi yaklaşık 360-469 tür ile temsil edilmektedir (Shen ve ark., 2021). “Takke” olarak bilinen *Scutellaria* cinsi Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Doğu Asya gibi ılıman ve tropikal bölgelerde yaygın bulunur. *Scutellaria* türlerinin çoğu, 5 cm ila 1 m boyunda tek yıllık veya çok yıllık otsu bitkiler iken; bazı türler çalılık tarzında ve sucul ortamda yetişirler. *Scutellaria* türlerinin yaprakları karşılıklı ve dört köşeli gövdeye sahiptirler. Çiçeklerin alt ve üst dudakları olan *Scutellaria* cinsinin tür tanımlanmasında kaliks üzerindeki tipik kalkan tarafından en kolay şekilde tanınır (Jiangsu New Medical College, 1977). Bu cinsin türleri binlerce yıldır yerel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Etnofarmakolojik çalışmalara göre, *Scutellaria* cinsi ekstrelerinin veya etken maddelerinin antitümör, hepatoprotektif, antioksidan, antiinflamatuvar, antikonvülsan, antibakteriyel, antiviral, nöroprotektif ve hafıza geliştirici etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Shang ve ark., 2010). Başka bir çalışmada, *Scutellaria* cinsine ait türlerin antidiyabetik, antidepresan etkilere sahip olduğunu ve ayrıca omurilik yaralanmalarına, kronik obstrüktif akciğer hastalığına ve pulmoner arteriyel hipertansiyona karşı koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Shen ve ark., 2021). *Scutellaria* başta fenolik bileşikler (flavonoidler, feniletanoid glikozitler) ve terpen bileşikleri (iridoit glikozitler, diterpenler ve triterpenoidler) olmak üzere alkaloidler, fitosteroller ve polisakkaritler içerdiği rapor

edilmiştir (Shang ve ark., 2010). Bu çalışmada ayrıca, flavonoidlerin ana bileşikleri olan baicalin, baicalein, wogonin ve ganhuangenin, antikanser, anti-HIV, antibakteriyel, antiviral, anti-inflamatuar ve antikonvülsan etkilere sahip olduğu belirlenirken; diterpenlerin ana bileşikleri olan Jodrellin A, jodrellin B, scutalbin A ve scutecypol B'nin iştahı önleyici etkileri olduğu belirlenmiştir.

Scutellaria türleri üzerinde pekçok *in vivo* ve *in vitro* etkilerin araştırıldığı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

S. baicalensis ve iki ana biyoaktif bileşeni, baicalin ve baicalein, metabolik sendromun ve obezite, hiperlipidemi, ateroskleroz, diyabet gibi ilgili bozuklukların ve bunları takip eden komplikasyonların kontrolü üzerinde ümit verici etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Rahimi ve ark., 2021).

STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda *S. baicalensis* etanolik kök ekstresinin antioksidan, antidiyabetik ve lipit profilini iyileştirmenin yanı sıra pankreatik insülin içeriğini de arttırdığı belirlenmiştir (Waisundara ve ark., 2008).

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda *Rhizoma coptidis* ve *Scutellaria baicalensis* bitki çifti ve ana bileşenlerin bağırsak disakkaridazlarının artan aktivitelerini kısmen inhibe ederek ve plazma insülin seviyesini yükselterek anti-hiperglisemik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2013).

Tip 2 diyabet ve komplikasyonlarının tedavisinde *S. baicalensis* Georgi'de bulunan baicalin, baicalein, wogonoside ve wogonin'in patogenezi ve klinik etkilerinin derlendiği çalışmada, *Scutellaria* flavonoid'in tip2 diyabet ve komplikasyonlarının tedavisinde iyileştirici etkiye ve insan sağlığının iyileştirilmesinde geniş uygulama alanına sahip olabileceğini vurgulamışlardır (Yingrui ve ark., 2022).

Scutellaria-coptis otunun Tip 2 diyabet KK-Ay farelerinde ve RAW264.7 makrofajlarında anti-diyabetik özelliklere sahip olduğunu bildirmişler (Zhang ve ark., 2019).

S. baicalensis sürgünlerinin flavonoidler açısından zengin özü ve bunun sekiz yüksek içerikli flavonoidlerinin, α -glukosidaz ve α -amilaza karşı inhibisyon etkilerinin

araştırıldığı çalışmada, ekstre flavonoidlerin doğrudan enzimleri inhibe edici etkilerinin yanı sıra, artan oksidatif streslerin neden olduğu çeşitli serbest radikalleri temizleyerek tip 2 diyabetin iyileştirilmesine de yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir (Li ve ark., 2018).

Geleneksel Çin tıbbında *S. baicalensis* Georgi, diyabet üzerinde dikkate değer bir iyileştirici etkisinin olduğu ve bu etkinin AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) yolu aracılığıyla otofajiyi indükleyerek yüksek glikoz altında insülin sekresyonunu artırdığını ve apoptozu azalttığı bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2022).

Tip 2 diyabet db/db türü obez erkek fareler üzerinde yapılan çalışmada, *S. baicalensis* ekstrelerinin, kilo alımı ve hipertrigliserideminin tedavisi için adjuvan terapötik ajan olarak yararlı potansiyel işlevini ortaya koyan, güçlü anti-obezite ve anti-hipertrigliserid etkileri olduğu rapor edilmiştir (Song ve ark., 2013).

S. baicalensis ve *C. chinensis*'nin bağırsak mukozal bariyerinin korunması ile ilişkili mekanizmalar sayesinde, TLR-4/TRIF ve TNFR-1/NF- κ B sinyal yollarını içeren enflamasyonun inhibisyonu ve bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesiyle, hasarlı bağırsak bariyerini onararak, dolaşımdaki bağırsak kaynaklı lipopolisakkarit (LPS) ve inflamatuvar faktörlerin miktarını azaltabileceğini böylece Tip 2 diyabette terapötik bir etki sağlayabileceği vurgulanmıştır (Zhang ve ark., 2020).

STZ (60 mg/kg intraperitoneal) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda *S. baicalensis*'in penil ereksiyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, 300 mg/kg/gün *S. baicalensis* ekstre uygulamasının penil korpus kavernozumun NO/cGMP yollarının aktivasyonu yoluyla penil erektil disfonksiyonu iyileştirdiğini belirtmişler (Li ve ark., 2016).

S. baicalensis'te bulunan pirogallol tipi polifenollerin potansiyel amiloid peptit inhibitör etkisinin olduğu vurgulanmıştır (Wang ve ark., 2022).

2.6.1. *Scutellaria orientalis* L. Subsp. *pichleri*

Türk geleneksel tıbbında 'kaside' diye bilinen *Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*, *Scutellaria pinnatifida* subsp. *pichleri* (Staf) Rech. f.'nin sinonimi olarak kabul edilir. Bu bitkinin fitokimyasal içerik analizi çok fazla çalışılmakla beraber preklinik kullanımına ilişkin *in vivo* çalışmalar yok denecek kadar azdır. *Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*, türünün toprak üstü ve çiçek kısımlarının Türkiye halk hekimliğinde analjezik, antikanser ve antihemoroit tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Mükemre ve ark., 2015; Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2009). *S. orientalis* toprak üstü kısımlarından kaynatılarak hazırlanan bir bardak çayın günde iki kez kullanılmasının kan durdurucu etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010). Bir başka çalışmada, *S. orientalis* yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan bir bardak çayın aç karnına günde iki kez alınmasının analjezik, kanser ve hemoroid tedavisinde yararlı olduğu önerilmiştir (Zengin ve ark., 2019). *S. orientalis* kök ekstresinin insan kolon hücre hatlarında başlıca anti-kanser ajanlarının varlığını gösteren bir antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Garari ve ark., 2021). *Scutellaria orientalis*'in su ve etanol ekstraktlarının ABTS• ve DPPH• radikalleri temizleme kapasitesine göre kuvvetli antioksidan aktivite gösterdiği ve doğal antioksidan potansiyel kaynağı olduğu belirlenmiştir (Türkoğlu, 2010).

S. orientalis β -karyofillen, germacrene D, bisiklogermakren, karyofilen oksit, spathulenol ve karyofilenol II gibi major uçucu yağ bileşimine sahiptir (Yılmaz ve ark., 2019). *S. orientalis* bitkisinin fenolik bileşik miktar tayininde apigenin, apigenin-oglukuronid, scutellarin ve apigenin-C-hekzosit-C-pentosit gibi flavon bileşikleri bakımından zengin olduğu ve yüksek flavon ve total fenolik sayesinde *in vitro* antidiyabetik enzim inhibisyon özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Zengin ve ark., 2019).

Bu çalışmada, *Scutellaria orientalis* toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanolik liyofilize ekstresinde LC-MS/MS ile fenolik içeriğinin belirlenmesi ve STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda iyileştirici etkileri biyokimyasal, antioksidan ve antidiyabetik bulgular ışığında ortaya konulması amaçlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler

AE-S90-MD UV/VIS spektrofotometre, NÜVE NF 1200R soğutmalı santrifüj, ISOLab LS-EJ-320AB hassas terazi, JSWB-22T sıcak su banyosu, WTW İmolab pH 7110 pH metre, WiseMix VM-10 vorteks, Eppendorf plus mikro pipet, Ultrasonik homojenizatör (SONOPULS HD 2200, Bandelin, Berlin, Germany), Vestel derin dondurucu, Wisecryo difiriz (-80 °C), Kross saf su cihazı, Rotary mikrotom (H315, Mikrom GmbH, Almanya), Mikroskop (Leica DMI 6000B model), enjektör, falkon 50 mL plastik tüp, EDTA'lı ve Biyokimya tüpleri, diseksiyon seti, kurutma kâğıdı.

3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Bovin serum albumin (Sigma, A2153-10G), Beta Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), Coomasie Blue G, Etil alkol (Sigma, Cas no:64-17-5), Metafosforik asit (HPO_3), Tiyoarbitürik asit (TBA), Trikloro asetik asit (TCA), 1.1.3.3.tetraethoksipropan (MDA), Askorbik asit, Demir II sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Okside glutatyon (GSSG), Redükte glutatyon (GSH), 5-5'-Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), Hidroksi metil amino metan (Tris), Hidroklorik asit (HCl), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Coomasie Blue G, Hidrojen peroksit (H_2O_2), Ketamin (%10 luk).

3.1.3. Bitki

Çalışmada Kaside (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) bitkisinin toprak üstü kısımları kullanıldı. Bitki Van Gürpınar ilçesinden Mayıs 2022'de toplandı. Güneşten korunarak gölgede kurutulan bitki, teşhis için bir örnek alınarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalında görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin EROĞLU tarafından teşhis edildi. Teşhis sonrası bitkinin *Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri* olduğu rapor edilerek, bir örneği 165215 nolu kayıt numarasıyla Van Fen Fakültesi Herbaryumu (VANF)'nda kayıt altına alındı.

3.1.4. Deney hayvanı (Sıçan)

Deneyisel çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen 2-3 aylık, 150-250 g ağırlığında 6+42=48 adet *Wistar albino* ırkı erkek sıçanlar kullanıldı. Altı adet sıçan toksiste testi için geriye kalan kırk iki tanesi ise normal çalışmada kullanıldı. Sıçanlar oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodunda, standart plastik kaplarda *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Yapılacak çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 23/12/2021 tarih ve 2021/12-13 sayılı karar ile onay alındı ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 01/12/2022 tarih ve 2022/12-18 sayılı kararı ile kesin sonuç raporu ile çalışma sonuçlandırıldı.

3.2. Yöntem

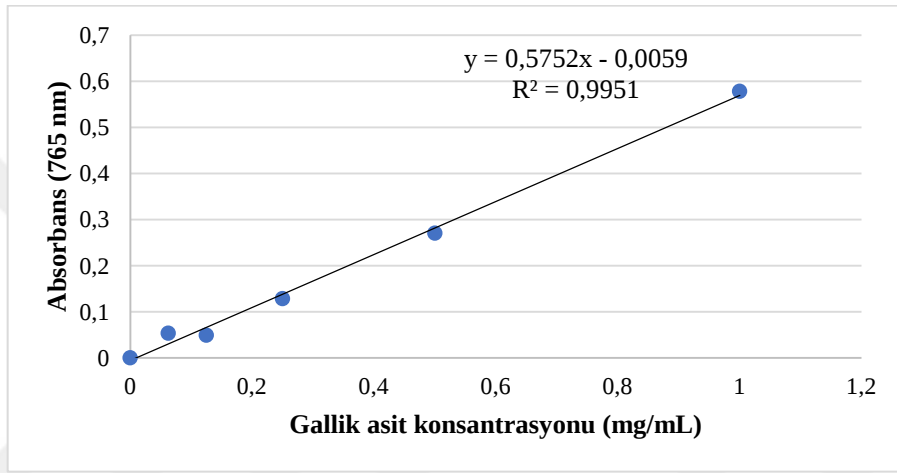
3.2.1. Etanolik liyofilize ekstrenin hazırlanması

Liyofilize ekstre Dogan ve ark.'a (2018) göre hazırlandı. Özetle; toprak, toz ve haşerelerden temizlenmiş toprak üstü bitki numuneleri gölgelik laboratuvar ortamında iyice kurutulmaları sağlandı. Kuruyan çiçek kısımları blender yardımı ile toz haline getirildikten sonra 40 g örneği 1 L % 80'lik etanol içinde 2 saat süreyle çalkalayıcıda karıştırıldı. Kaba kurutma kağıdından süzüldü. Süzülen örnekler enjektör yardımıyla 0.45 µm'lik hidrofilik filtreden geçirildi. +37 °C'de evaporatör yardımıyla çözücünden arındırılan yoğunlaştırılmış fraksiyonlar -85 °C sıcaklık ve 50 millitor basınç altında liyofilizatör cihazında kuruyana kadar bekletildi. Elde edile liyofilize ekstreler deney uygulamasına kadar -20 °C'de saklanarak deneysel uygulamalar için hazır hale getirildi. Deney sırasında daha önce belirlenmiş olan dozlar canlı hayvan ağırlığına göre ekstreler mg/kg olarak saf suda çözündürülerek sıçanlara gavaj olarak verildi.

3.2.2. Toplam fenolik miktar tayini

Gerekli ekstre miktarı tartıldı, konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde etanolde (% 75) çözdürüldü. Daha sonra örnekten 20 µL alınıp, üzerine sırasıyla 1580 µL distile su (dH₂O), 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ve 300 µL %20'lik sodyum karbonat çözeltisi eklendi. Kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek için 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150

mg/mL, 250 mg/mL, 500 mg/mL konsantrasyonlarda gallik asit (GA) dilüsyonları hazırlandı ve örnek yerine GA dilüsyonları konularak diğer çözeltiler aynı miktarda ilave edildi. Tüm tüpler 40°C'de 30 dak. İnkübasyona bırakıldı. Süre sonunda absorbanslar 765 nm dalga boyunda kör olarak kullanılan etanole karşı ELISA'da okundu (Singlet ve Rossi, 1965). GA çözeltileri yardımıyla hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre (Şekil 5), örneğin absorbanası kullanılarak toplam fenol konsantrasyonu GA eşdeğeri olarak hesaplandı. Ekstrenin toplam fenol miktarı mg/g ekstre $\pm$ standart sapma olarak verildi.

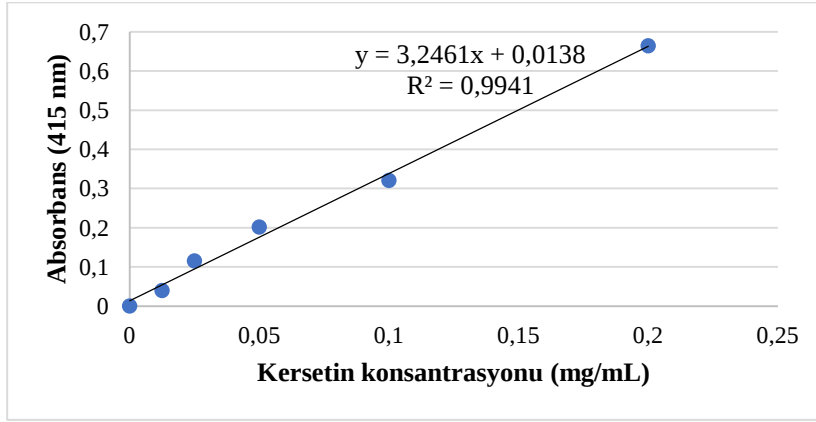


Şekil 5. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi

3.2.3. Toplam flavonoit miktar tayini

Gerekli ekstre miktarı tartıldı, konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde etanolde (% 75) çözdürüldü. Daha sonra örnekten 500 μ L alınıp, üzerine sırasıyla 1500 μ L etanol (% 75), 100 μ L %10'lük $AlCl_3$, 100 μ L 1M sodyum asetat çözeltisi ve 2800 μ L dH_2O eklendi. Kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek için 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda kersetin'in kalibrasyon çözeltileri hazırlandı ve örnek yerine kersetin dilisyonları konularak diğer çözeltiler aynı miktarda ilave edildi. Karışımlar 30 dak. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda absorbanslar 415 nm dalga boyunda kör olarak kullanılan etanole karşı ELISA'da okundu (Woisky ve Salatino, 1998). Örneğin absorbanasından, kersetin çözeltileri yardımıyla hazırlanan kalibrasyon eğrisine (Şekil 6) göre, total flavonoit konsantrasyonu kersetin eş değeri

olarak hesaplandı. Ekstrenin toplam flavonoit miktarı mg/g ekstre $\pm$ standart sapma olarak verildi.



Şekil 6. Toplam flavonoit madde tayininde standart olarak kullanılan kersetinin kalibrasyon eğrisi

3.2.4. LC-MS/MS analizi

Kaside (*Scutellaria orientalis* L. subsp. *pichleri*) bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan % 80’lik etanol ekstresinin fitokimyasal içerik tanımlanması ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi (UHPLC) cihazı ile daha önce validasyonu yapılan 53 fitokimyasalın taranması esasına göre Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’ndeki Yılmaz (2020) metoduna göre yapıldı. Bu 53 bileşiğin 3 tanesi bitki bileşiminde bulunmayan ticari olarak satın alınan saf madde iç standartlardır (IS). Bunlar sırasıyla, ferulik asit D1 (20 mg/L), rutin D2 (1 mg/L) ve kersetin D3 (5 mg/L) dir.

Analiz için Shimadzu-Nexera model UHPLC cihazına bağlı tandem kütle spektrometresi kullanıldı. Kullanılan ters faz UHPLC sistemi, bir otoörnekleyici (SIL-30AC model), bir kolon fırını (CTO-10ASvp model), gradiyent pompa sistemi (LC-30AD model) ve bir degazer (DGU- 20A3R model) bileşenlerinden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım Agilent Poroshell 120 EC-C18 model (150 mm×2.1 mm, 2.7 μ m) bir kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40°C’ye ayarlandı. Elüsyon gradiyenti, mobil faz A (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit) ve mobil faz B (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit)’den oluşturuldu.

Gradyent elüsyon profili, %20-100 B (0-25 dk), %100 B (25-35 dk), %20 B (35-45 dk) şeklinde kullanıldı. Mobil faz akış hızı 0.5 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 5 µl olarak belirlendi (Yılmaz, 2020).

Kullanılan LC-MS/MS sisteminin kütle spektrometre dedeksiyonu için hem pozitif hem de negatif modda çalışan bir elektrosprey iyonlaşma kaynağı ile donanmış Shimadzu LCMS-8040 model sıralı kütle spektrometresi kullanıldı. LC-ESI-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı (Shimadzu) ile alınarak işlendi. Fitokimyasalların miktar tayinlerinin tespiti için Çoklu Reaksiyon Görüntüleme (MRM) modu kullanıldı. MRM yöntemi, belirli ana iyon-parçalanma iyonu geçişlerinin taranmasına dayalı olarak fitokimyasalların seçici olarak tespit edilip miktarsal tayininin yapılması için optimize edildi. Optimum fitokimyasal fragmentasyonu ve arzulanan parçalanma iyonlarının maksimal geçişini elde etmek için çarpışma enerjileri optimize edildi. Uygulanan MS çalışma şartları, kurutucu gaz (N₂) akışı 15 L/dk; nebulizer gaz (N₂) akışı 3 L/dk; DL sıcaklığı 250°C; heat block sıcaklığı 400°C ve arayüz sıcaklığı 350°C olarak belirlenerek ekstredeki kantitatif miktar tayini mg analit/g ekstre olarak verildi (Yılmaz, 2020).

3.2.5. Toksisite testi ve dozların belirlenmesi

Toksisite testi Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü'nün (OECD) 432'ye göre yapıldı. Toksisite testinde 6 adet *wistar albino* ırkı erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlara 24 saatte bir sırasıyla 2000, 300 ve 50 mg/kg *S. orientalis* (SO) ekstresi gavaj olarak verildi. Toksisite testi sonrası sıçanlarda morbidite veya mortalite gözlenmedi. Toksiste testi sonrası çalışmada 100, 200 ve 400 mg/kg SO dozları uygulandı.

3.2.6. Streptozotosinle (STZ) sıçanlarda diyabet oluşturulması

Çalışmaya başlamadan kontrol grubu dışındaki gruplara 0.1 M sitrat tamponu (pH:4.5) içinde çözdürülen STZ (50 mg/kg, intraperitnal, i.p) uygulandı (Duman ve ark., 2022). Uygulama sonrası 72. saatte glukometre yardımıyla kuyruk kanı glukoz değerleri ölçülerek ≥ 200 mg/dL çıkan hayvanlar diabetes mellitus (DM) olarak kabul edildi.

3.2.7. Deneyisel muamele ve grupların oluşturulması

21 gün sürdürülen çalışmada 42 adet rat 6 eşit gruba (n=7) ayrıldı.

(I) Kontrol grubu: Gruptaki ratlar belirlenen süre boyunca standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı ve ek olarak günde tek doz (1mL/kg) fizyolojik su gavaj olarak verildi.

(II) DM grubu: Gruptaki DM'li ratlar belirlenen süre boyunca standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Ayrıca, DM'li ratlara günde tek doz (1mL/kg) fizyolojik su gavaj olarak verildi.

(III) DM + SO-100 mg/kg ekstre grubu: Gruptaki DM'li ratlar belirlenen süre boyunca standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Ayrıca, DM'li ratlara günde tek doz (100 mg/kg) ekstre gavaj olarak verildi.

(IV) DM + SO-200 mg/kg ekstre grubu: Gruptaki DM'li ratlar belirlenen süre boyunca standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Ayrıca, DM'li ratlara günde tek doz (200 mg/kg) ekstre gavaj olarak verildi.

(V) DM + SO-400 mg/kg ekstre grubu: Gruptaki DM'li ratlar belirlenen süre boyunca standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Ayrıca, DM'li ratlara günde tek doz (400 mg/kg) ekstre gavaj olarak verildi.

(VI) DM + glibenklamid (Gly) (3 mg/kg) grubu: Gruptaki DM'li ratlar belirlenen süre boyunca standart yem ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Ayrıca, pozitif kontrol grubu olarak DM'li ratlara günde tek doz oral antidiyabetik ilaç olan glibenklamid (3 mg/kg) gavaj olarak verildi (Agirman ve ark., 2022).

Ayrıca, deney süresince haftalık canlı ağırlık değişimleri ve kan glukoz değerlerine bakıldı.

3.2.8. Kan ve doku örneklerinin alınması

Yirmi bir günlük deney sonunda sıçanlar ketamin HCl (50 mg/kg) ve ksilazin HCl (10 mg/kg) ile intraperitoneal (ip) olarak anestezi altına alındı. Anestezi altında

enjektör ile kalpten alınan kan biyokimya ve EDTA'lı hemogram tüplerine alındı. Ayrıca pankreas, karaciğer ve böbrek dokuları alınarak derin dondurucuda analiz aşamasına kadar saklandı.

3.2.9. Doku homojenizasyonu

Derin dondurucuda bekletilen sıçanların pankreas, karaciğer ve böbrek dokuları oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak buz üzerinde çözünmeleri sağlandı. Ekstraksiyon için 1 mmol/L EDTA ve 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.4) içeren tampon kullanıldı (Dogan ve ark., 2018). 500 mg doku üzerine 5 mL soğuk tampon eklenerek, dokular cam bagetle iyice ezilerek Ultrasonic Processor homojenizatörde (SONOPULS HD 2200, Bandelin, Berlin, Germany) 3 dakika boyunca homojenize edildi. Ekstre hemen +4 °C'de 30 dakika 9500 rpm'de santrifüj edildi. Pankreas, karaciğer ve böbrek dokusundan elde edilen berrak süpernatantlarda hedeflenen parametre ve enzim tayinleri için kullanıldı.

3.2.10. Total protein tayini

Total protein konsantrasyon tayini için standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı (Bradford, 1976). Protein tayini, proteine bağlanan Coomassie Blue G boya reaktifinin, spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyonunun ölçülmesi prensibine dayanır. Total protein tayini pankreas, karaciğer ve böbrek dokuları süpernatantlarında bakılan malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH), antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S- transferaz (GST) ve glutatyon reduktaz (GR) mg/protein cinsinden ifade edildi.

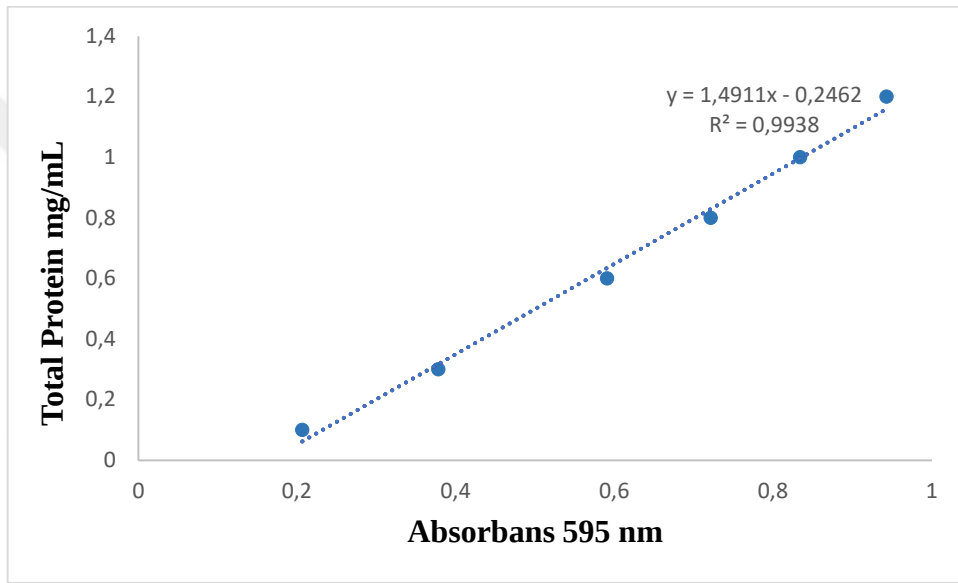
Çözeltiler

1. Konsantre Bradford solüsyonu (5×): 100 mg Coomassie Blue G sırasıyla 50 mL absolüt etanol ve 100 mL ortofosforik asit (% 85) içerisinde çözündürüldü. Daha sonra solüsyon distile su ile 200 mL'ye tamamlandı ve filtre edildi.

2. Bradford çalışma solüsyonu (1×): Yukarıda hazırlanan ve filtre edilen solüsyonun distile su ile 1:5 oranında sulandırılması ile hazırlandı.

Protein Tayin Yöntemi

6 adet standart 10 mg/mL stok BSA'dan seri sulandırmalar yapılarak hazırlandı. Standartlar, örnek ve kör bradford çalışma solüsyonu ile muamele edildikten sonra 20 dk karanlıkta inkübe edildi. 20 dk sonunda 595 nm dalga boyunda spektrofotometre köre karşı sıfırlandıktan sonra örnek ve standartların absorbansı ölçüldü. Standartlara karşılık gelen konsantrasyon-absorbans değerleri ile standart eğri grafiği oluşturuldu (Şekil 7). Örneklerdeki total protein konsantrasyonu eğri kullanılarak sonuçlar mg/mL protein olarak ifade edildi.



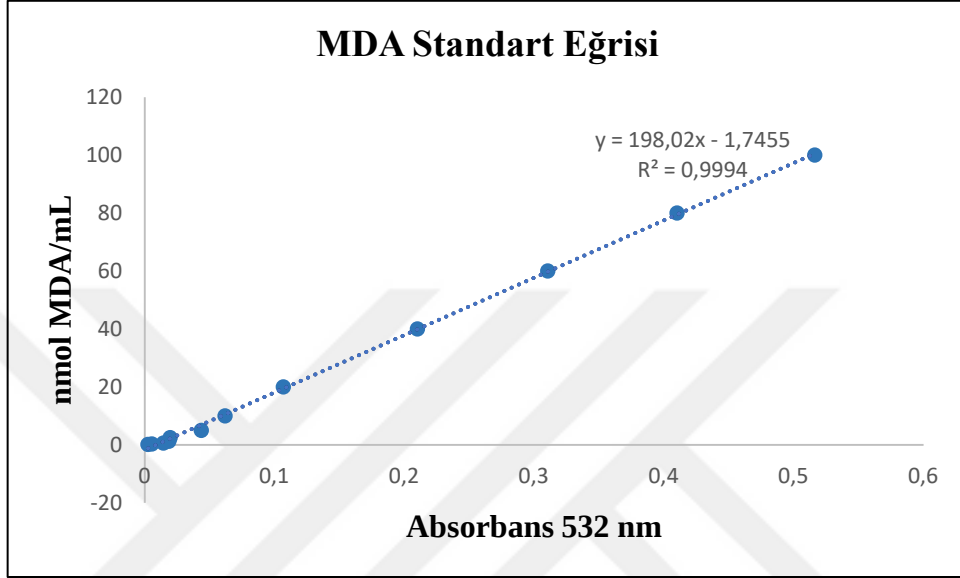
Şekil 7. Protein standart eğrisi

3.2.11. Rutin serum biyokimyasal ve HbA1c analizleri

Serum karaciğer ve böbrek hasarı biyomarkırlarından aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), kreatinin, üre, glukoz ve lipid profili [total trigliserit (TG), total kolesterol (TC) ve yüksek yoğunluklu lipoptotein_kolesterol (HDL_c)] parametreleri Cobas 6000 otoanalizör cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve bu cihaza özgü kitlerde okundu. % HbA1c ise Tina-quant hemoglobin A1c Gen.3 COBAS INTEGRA/cobas c systems, (Roche Diagnostics, Indianapolis, Almanya) kitlerde okundu.

3.2.12. Malondialdehit tayini

Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid, tiyobarbitürik asit ile pembe renkli forma girmesi prensibine dayanır (Buege ve Aust, 1978).



Şekil 8. MDA standart eğrisi

Deneyin yapılışı

MDA standart eğrisi için 1.1.3.3.tetraethoksiopropan kullanıldı. Standar eğri şekil 8'deki gibidir.

MDA seviyesi karaciğer, böbrek ve pankreas doku süpernatantlarında tabloda belirtildiği gibi ölçülmüştür.

İşlem sonrası tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 532 nm dalga boyunda tek okuma yapıldı. Sonuçlar standart grafikten (Şekil 8) değerlendirildi.

Tablo 1. MDA yöntemi

Ayıracılar	Numune (mL)	Standart (mL)	Kör (mL)
Numune	0.1	---	---
Kör	---	---	0.1
Standart	---	0.1	---
Tris-HCl tamponu (150 mM)	0.1	0.1	0.1
Askorbik asit çözeltisi (1.5 mM)	0.1	0.1	0.1
FeSO ₄ .7H ₂ O (1 mM)	0.1	0.1	0.1
Distile Su	0.6	0.6	0.6
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra tüpler karıştırıldı. Pipetlemeden sonra tüpler 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.			
TCA (%10)	1	1	1
TBA Çözeltisi (%0,375)	2	2	2
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra tüpler vortekslendi. Tüpler vortekslendikten sonra kaynayan su banyosunda (95 °C) 15 dakika bekletildi.			

3.2.13. Redükte glutatyon tayini

İndirgenmiş glutatyonun (GSH), fosfat tamponu kullanılarak 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile süpernatanttaki sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin spektrofotometrik olarak 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Beutler ve ark., 1963).

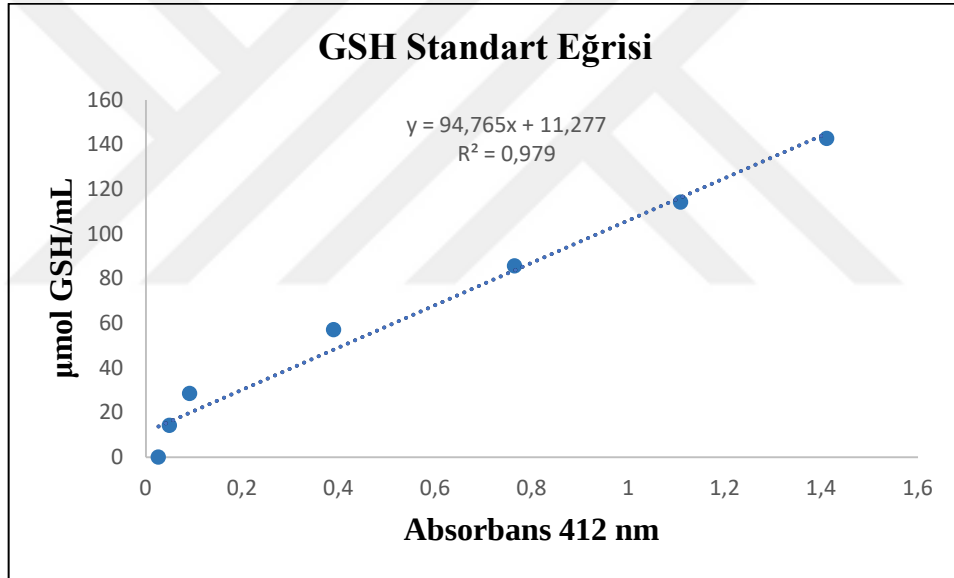
Çözeltiler

1. Fosfat Çözeltisi: 0.3 M disodyum fosfat, distile su ile hazırlandı (pH:6.8).
2. DTNB (Ellman's Ayıracı): 40 mg DTNB, % 1 sodyum sitrat, 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
3. Standart çözeltileri: Standartlar için 100 µM GSH stok çözeltisi fosfat tamponu içerisinde taze olarak hazırlandı daha sonra stok çözeltisi seyreltilerek 6 adet standart hazırlandı (Şekil 9). Pipetleme aşağıdaki tabloya göre yapıldı.

GSH standartlarına karşılık gelen absorbans değerlerinden oluşturulan standart eğriye göre karaciğer, böbrek ve pankreas doku süpernatantlarında GSH konsantrasyonu hesaplanarak sonuçlar µmol GSH /mg protein olarak ifade edildi.

Tablo 1. GSH yöntemi

Ayrıraçlar	Numune (mL)	Standart	Kör (mL)
Numune	0.2	---	---
Standart	---	0.2	---
Distile su	---	---	0.2
Fosfat Çözeltisi	1	1	1
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra vortekslendi. Sonra sıcak su banyosunda 60 °C’de 10 dakika inkübe edildi ve çıkarılarak oda ısısına getirildi.			
DTNB (Ellman’s Ayrıracı)	0.2	0.2	0.2
Spektrofotometrede 412 nm’de köre karşı optik dansiteleri okundu.			



Şekil 9. GSH standart eğrisi

3.2.14. Glutasyon S-transferaz enzim tayini

Glutasyon S-transferaz, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun –SH grubu arasındaki tepkimeyi katalizler. Enzim aktivitesi 340 nm’de 37 °C’de CDNB ile glutasyon konjugasyon şiddetini ölçerek tespit edilir (Mannervik ve Guthenberg, 1981).



Deneyin yapılışı

Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen karaciğer, böbrek ve pankreas doku süpernatantları kullanıldı. Karışımlar Tablo 3.3'e göre 3.5 mL'lik küvete pipetlenerek 340 nm'de absorbands ölçümü gerçekleştirildi.

Absorbanslar, 3 dakika boyunca 30 saniyede bir kaydedilerek her örneğin absorbandsındaki dk başına değişim (ΔA) belirlendikten sonra GST'nin molar ekstinksiyon katsayısı (9.6 mmol/L/cm) ve küvetteki sulandırma oranı hesaba katılarak, enzimin mL'deki aktivitesi belirlendi. Bulunan değer, örneğin mL'sindeki total protein miktarına bölünerek GST'nin spesifik aktivite değeri hesaplanarak sonuçlar, nmol CDNB-glutasyon konjugatı/dk/mg protein olarak ifade edildi.

Tablo 3. Karışımların küvete alınması ile GST ölçümün yapılması

	Kör (mL)	Numune (mL)	Son konsantrasyon
PBS	2.7	2.7	0.1 M
Distile Su	0.1	---	---
CDNB	0.1	0.1	1 mM
GSH	0.1	0.1	1 mM
Süpernatant	---	0.1	---

3.2.15. Glutasyon redüktaz enzim tayini

Prensip: GR GSSG'nin NADPH tarafından GSH'a indirgenmesini katalize eder. GR aktivitesi (EU), 37 °C'de 340 nm dalga boyunda dakika başına harcanan NADPH miktarından hesaplandı. 5 dakika boyunca ölçülen absorbandsın lineer olan kısmı dakika başına hesaplandı ($A = \epsilon \times b \times c$), (Carlberg ve Mannervik, 1985). Enzim aktiviteleri karaciğer, böbrek ve pankreas doku süpernatantlarında ölçüldü. Ve sonuçlar U/g doku olarak hesaplandı.



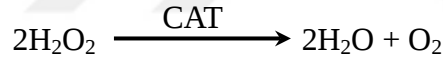
Analiz materyali olarak daha önce muhafaza edilen karaciğer, böbrek ve pankreas doku süpernatantları kullanıldı. Aşağıdaki tabloda yer alan miktarlar uygun şekilde karıştırılarak ölçüm yapıldı.

Tablo 4. GR karışımların küvete alınması ile ölçümün yapılması

Ölçüm Prosedürü	Kör (µL)	Numune (µL)
Fosfat Tamponu	1500	1500
Homojenat Tamponu	1200	-
β-NADPH 2 mM	150	150
GSSG 20 mM	150	150
Numune (Süpernatant)	-	1200

3.2.16. Katalaz enzim tayini

Prensip: Katalaz, aşağıdaki reaksiyona göre H₂O₂'in suya ve oksijene ayrılmasını katalizler. Katalaz enziminin aktivite tayini, 37 °C 240 nm'de H₂O₂'in tüketilme esasına dayanan spektrofotometrik metoda göre tespit edildi (Aebi, 1974).



Enzim aktiviteleri karaciğer, böbrek ve pankreas doku süpernatantlarında ölçüldü. Katalaz tarafından H₂O₂'in dekompoze olma oranı, spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda ölçüldü. Çünkü H₂O₂, ışığı bu dalga boyunda absorbe etmektedir. Kullanılan solüsyonlar aşağıda Tablo 5'teki gibi hazırlandılar.

H₂O₂ çözeltisi ise; absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponudur. Yaklaşık 300 mL, pH 7.50 mM olan fosfat tamponu renkli kaba aktarılır. Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna göre sıfırlanıp renkli kaptaki tampona 10-20 µL hacimlerle H₂O₂ ilave edilir. Optik Dansite (OD) 0.500 nm oluncaya kadar devam edilir ve aralarda karıştırılır.

Tablo 2. Katalaz fosfat tamponun hazırlanışı

Kimyasal	MA	50 mM için	Son Hacim (distile su)	Sol. Adı
KH_2PO_4	136.09 g/mol	6.805g	1000mL	A
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358.14 g/mol	17.907 g	1000 mL	B ₁
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	178.14 g/mol	8.907 g	1000 mL	B ₂
Na_2HPO_4 (saf)	141.96 g/mol	7.098 g	1000 mL	B ₃

Tablo 3. Katalaz fosfat tampon solüsyonların karıştırılarak hazırlanması

50 mM Fosfat tamponu (1 L)	A Solüsyonu (mL)	B Solüsyonu (mL)
pH 7.5 için	160	840

Deneyin yapılışı: Örnek ve tampon kuvartz küvet içerisine Tablo 6’da belirtilen miktarlarda bırakıldıktan sonra küvetin ağzı bekletilmeden kapatılır ve küvet hızlıca alt-üst edilerek absorbansı okunur. Absorbans azalması, her 15 sn’de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilir ve hesaplamada hesaplamada 2 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (A1) ve en düşük (A2) değerleri esas alınır.

Tablo 4. Katalaz tampon ve örneklerin küvete pipetlenmesi

Tampon	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H_2O_2 çözeltisi	0.01	-
H_2O_2 ’li fosfat tamponu	-	2.99
Süpernatant	-	0.01

Enzim aktivitesi hesabı: $A = e \times c \times L$,

A: absorbans/dakika, e: ekstinksiyon katsayısı, c: konsantrasyon, L: ışık yolu (1 cm).

H_2O_2 ’nin 240 nm’deki milimolar ekstinksiyon katsayısı: $0.0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
($0.0436 \text{ mM} = 0.0436 \text{ mmol/L} = 0.0000436 \text{ mmol/mL} = 0.436 \text{ } \mu\text{mol/mL} = 43.6 \text{ nmol/mL}$)

Katalaz aktivitesi (nmol/dk/mL) = $\Delta A 43.6 \times \text{Küvet içi sulandırma (Vt/Vö)} \times \text{SO}$

$$\text{Katalaz spesifik aktivitesi (nmol/dk/mg protein)} = \frac{\text{Katalaz aktivitesi (nmol/dk/mL)}}{\text{Total protein miktarı (mg/mL)}}$$

ΔA : Absorbansın 240 nm dalga boyunda dk başına değişimi

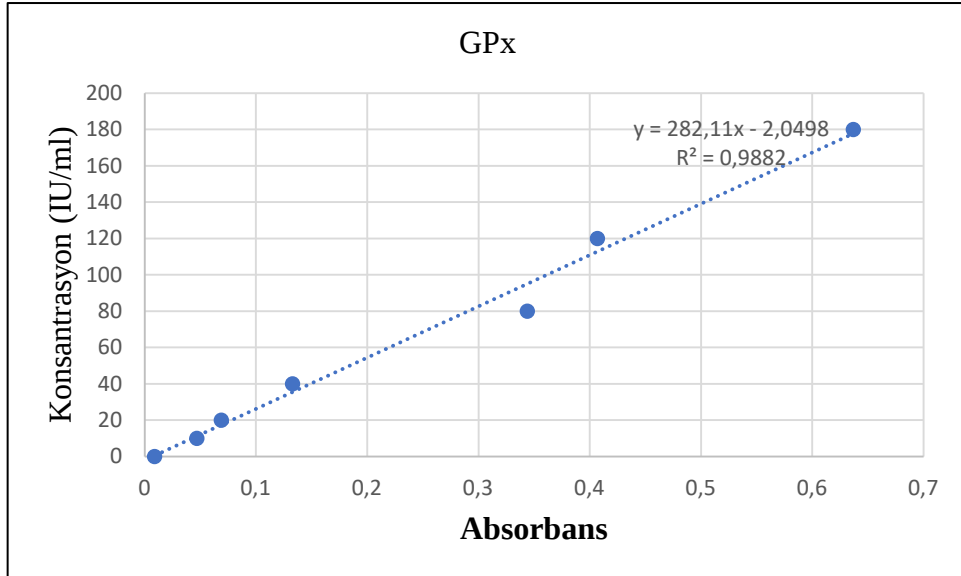
Vt: Toplam hacim

Vö: Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

3.2.17. Glutasyon peroksidaz tayini

Glutasyon peroksidaz enzim tayini AFG Bioscience (Katalog No: EK720976) Elisa kit protokoluna göre okundu. Karaciğer, böbrek ve pankreas dokuları fosfat tamponunda homojenize edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Standartlar belirlenen uygulama protokoluna göre hazırlandı ve devamında belirlenen uygun örnek konsantrasyonları hazırlanarak 96 kuyucuklu mikroparka okuyucuda (POLARstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Germany) 450 nm’de okundu ve değerler IU/mL olarak hesaplandı.

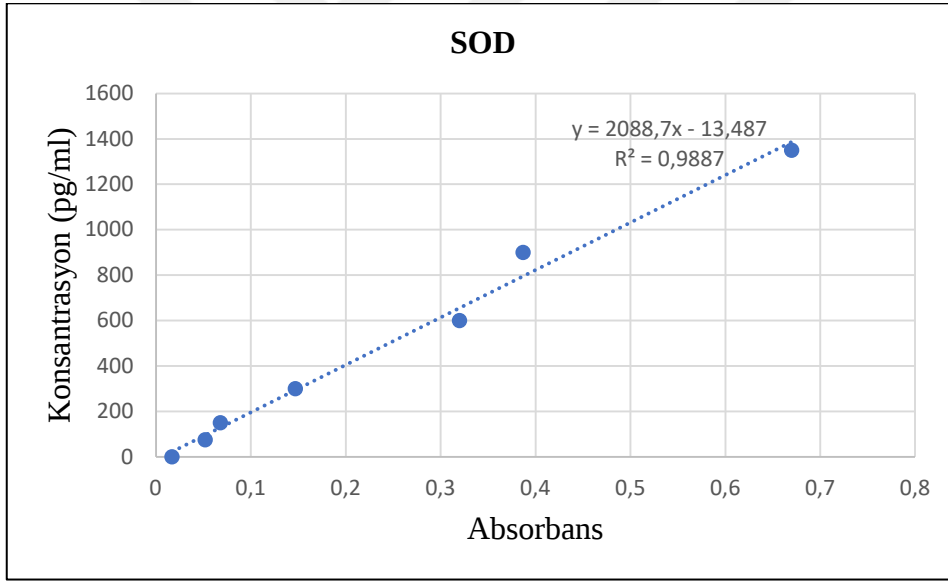


Şekil 10. GPx standart eğrisi

3.2.18. Süperoksit dismutaz tayini

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji basamağında üretilen süperoksit radikalının ($O_2^{\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandıran antioksidan bir enzimdir.

Süperoksit dismutaz enzim tayini AFG Bioscience (Katalog No: EK720188) Elisa kit protokoluna göre okundu. Karaciğer, böbrek ve pankreas dokuları fosfat tamponunda homojenize edildikten sonra elde edilen supernatantlarda gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Standartlar belirlenen uygulama protokoluna göre hazırlandı ve devamında belirlenen uygun örnek konsantrasyonları hazırlanarak 96 kuyucuklu mikroparka okuyucuda (POLARstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Germany) 450 nm’de okundu ve değerler IU/mL olarak hesaplandı.



Şekil 11. SOD standart eğrisi

3.2.19. İstatistiksel analizler

Çalışma sonunda elde edilen gruplara ait tüm veriler Graphpad prism 8 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İki'den fazla olan gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey Çoklu karşılaştırma testinden yararlanıldı. Tüm

analizlerden elde edilen ham değerler, grupların ortalaması $\pm$ standart sapma şeklinde sunuldu. Önem derecesi bütün testler için ($P < 0.05$) olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Tablo 8’de *S. orientalis* etanolik liyofilize ekstresinin verim yüzdesi, total fenolik ve flavonit miktarları verilmiştir. Solvent olarak % 80 etanol kullanılan ekstraksiyon işleminde ekstre verimi % 18.25 olarak belirlendi. Bitki ekstresindeki total fenolik madde tayini gallik asite eş değer (GAE) olarak mg fenolik madde/g ekstre şeklinde elde edilen kalibrasyon eğrisinden ($y=0,5752x-0,0059$ $R^2=0,9951$) 61.34 ± 3.29 olarak hesaplandı. Benzer şekilde total flavonoit madde tayini için kersetin eş değer olarak mg flavonoit madde/g ekstre şeklinde elde edilen kalibrasyon eğrisinden ($y=3,2461x + 0,0138$, $R^2=0,9941$) 48.60 ± 2.68 olarak hesaplandı.

Tablo 8. *S. orientalis* bitkisinin total fenolik ve flavonoit içerikleri

Bitki materyali	Solvent	% Ekstraksiyon verimi	Total Fenolik (mg GAE/g) ¹	Total flavonoid (mg RE/g) ²
<i>S. orientalis</i> ekstresi	% 80 etanol	18.25	61.34 ± 3.29	48.60 ± 2.68

Tablodaki her değer ortalama $\pm$ standart sapma (n=3) olarak sunulmuştur.

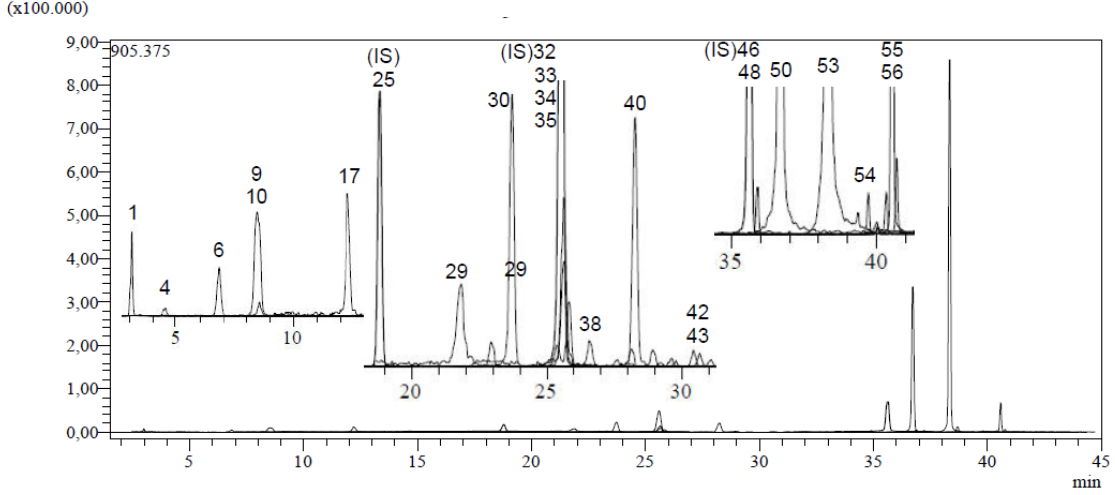
GAE¹: Gallik asit eşdeğeri; RE²: Kersetin eşdeğeri

Tablo 9. *S. orientalis* etanolik ekstresinin LC–MS/MS (mg analit/g ekstre) ile fitokimyasal içeriğin nicel olarak belirlenmesi

No ^a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
SOE ^b	0.701	N.D	N.D	0.026	N.D	0.155	N.D	N.D	0.283	0.021	N.D	N.D	N.D	N.D
No	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
SOE	N.D	N.D	N.D	0.077	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.A (IS)	N.D	N.D
No	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
SOE	0.045	0.617	N.D	N.A (IS)	0.625	0.249	0.381	N.D	N.D	0.087	N.D	0.656	N.D	0.108
No	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
SOE	0.051	N.D	N.D	N.A (IS)	N.D	0.04	N.D	0.932	N.D	N.D	1.653	0.002	0.209	0.019

No^a: Bakılan 53 adet standart fitokimyasal bileşikler gösterir. 1: Kinik asit. 2: Fumarik asit. 3: Akonitik asit. 4: Gallik asit. 5: Epigallokateşin. 6: Protokateşik asit. 7: Kateşin. 8: Gentisik asit. 9: Klorojenik asit. 10: Protokateşik aldehit. 11: Tanik asit. 12: Epigallokateşin galat. 13: 1,5-dikaffeoilkinik asit. 14: 4-OH Benzoik asit. 15: Epikateşin. 16: Vanilik asit. 17: Kafeik asit. 18: Siringik asit. 19: Vanilin. 20: Siringik aldehit. 21: Daidzin. 22: Epikateşin galat. 23: Piceid. 24: p-Kumarik asit. 25: Ferulik asit-D3-IS. 26: Ferulik asit. 27: Sinapik asit. 28: Kumarin. 29: Salisilik asit. 30: Sinarosid. 31: Miquelianin. 32: Rutin-D3-IS. 33: Rutin. 34: İzokersitrin. 35: Hesperidin. 36: o-Kumarik asit. 37: Genistin. 38: Rosmarinik asit. 39: Ellagik asit. 40: Kozmosiin. 41: Kuersitrin. 42: Astragalin. 43: Nikotiflorin. 44: Fisetin. 45: Daidzein. 46: Quercetin-

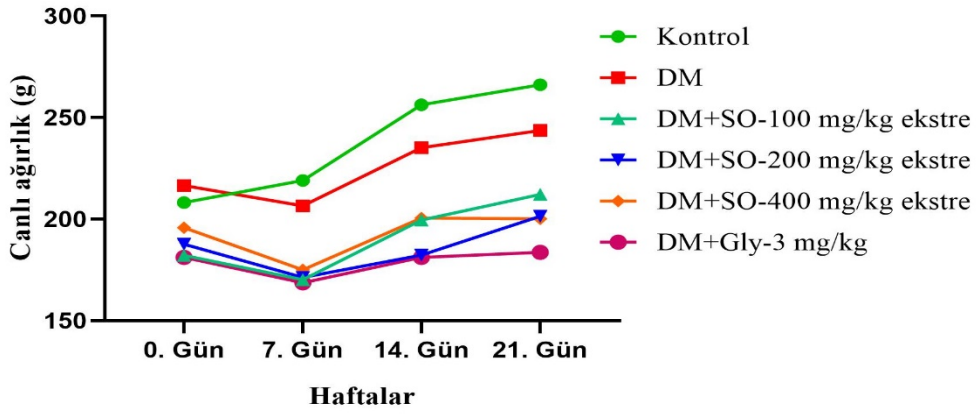
D3-IS. 47: Quercetin. 48: Naringenin. 49: Hesperetin. 50: Luteolin. 51: Genistein. 52: Kaempferol. 53: Apigenin. 54: Amentoflavon. 55: Chrysin. 56: Acacetin. SOE: *Scutellaria orientalis* ekstresi. N.D: Belirlenmedi. N.A: Uygulanmaz. IS: İç standart.



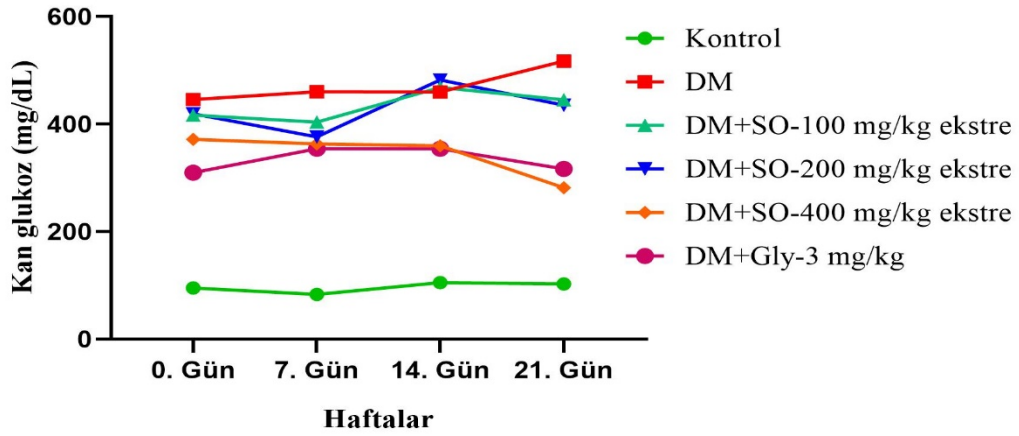
Şekil 12. *S. oerientalis* etanol ekstresinin LC–MS/MS kromatogramı

LC-MS/MS analizleri yöntem validasyonu yapılmış ve çoğunluğunu fenolik ve falavonoidlerin oluşturduğu 53 fitokimyasal bileşik ve 3 tane iç standarda (IS) göre yapıldı. Elde ettiğimiz LC-MS/MS sonuçlarına göre; *S.orientalis* etanolik liyofilize ekstresinde kolonda geliş zamanına (RT) göre kinik asit, gallik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, protokateşik aldehit, kafeik asit, salisilik asit, sinarosid, rutin, izokersitrin, hesperidin, rosmarinik asit, kozmosiin, astragalin, nikotiflorin, naringenin, luteolin, apigenin, amentoflavon, krizin ve akasetin (sırasıyla, 0.701, 0.026, 0.155, 0.283, 0.021, 0.077, 0.045, 0.617, 0.625, 0.249, 0.381, 0.087, 0.656, 0.108, 0.051, 0.04, 0.932, 1.653, 0.002, 0.209 ve 0.019 µg/g) kayda değer miktarda bulundu (Şekil 12 ve Tablo 9). SO ekstresinde major bileşikler olarak apigenin (1.653 µg/g), luteolin (0.932 µg/g), kinik asit (0.701 µg/g), kozmosiin (0.656 µg/g) ve epigallokateşin (0.625 µg/g) tespit edildi.

Canlı hayvan ağırlıkları (CHA) haftalık olarak şekil 13'te gösterilmiştir. Tüm grupların 7 ve 21. gün CHA artışları 0. güne (başlangıç) göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ayrıca, 7. gün CHA düşüşü tüm gruplarda 21. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

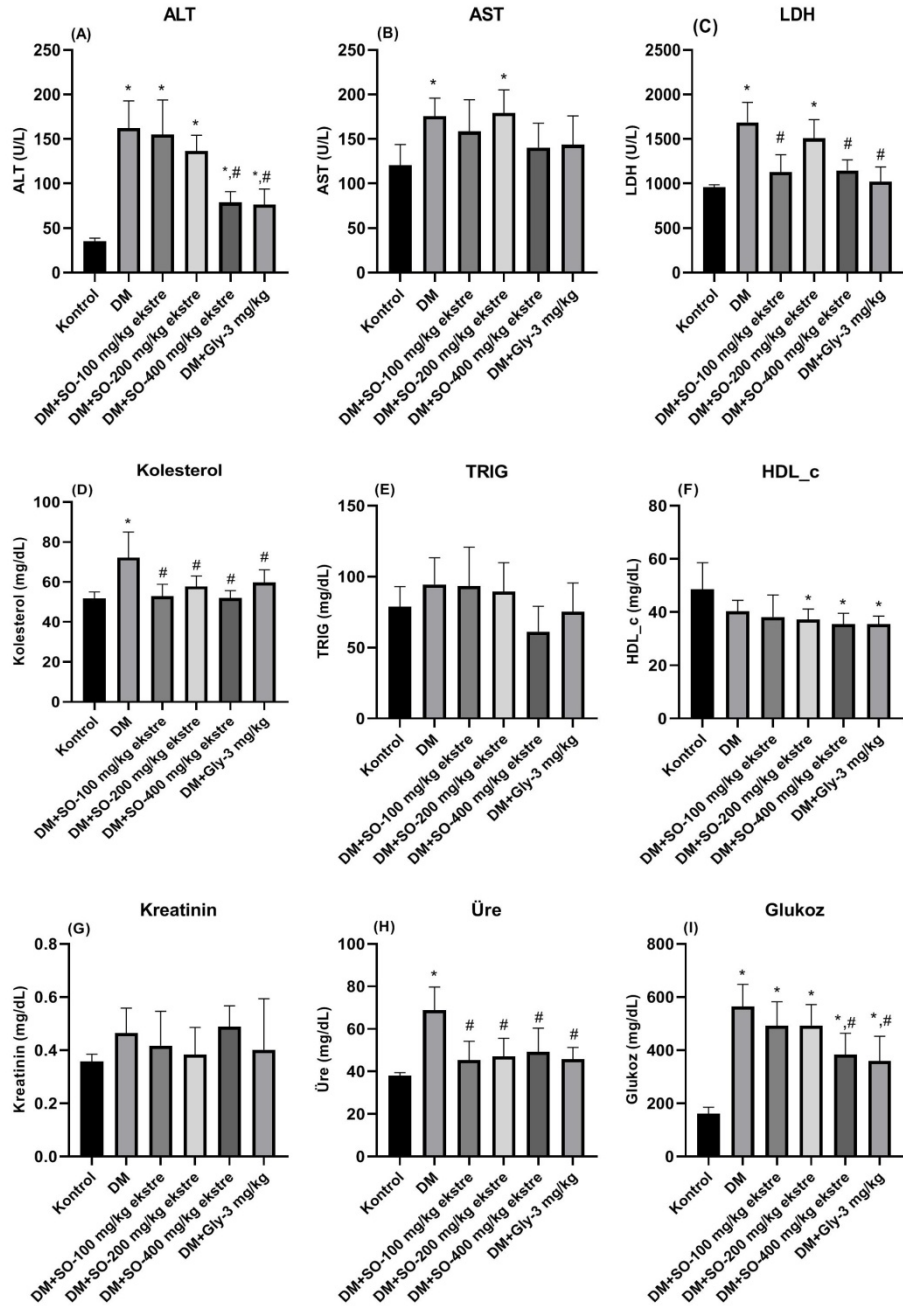


Şekil 13. Haftalık canlı hayvan ağırlık değişimi



Şekil 14. Haftalık kan glukoz değişimi

Şekil 14'te haftalık kan glukoz düzeyleri verilmiştir. Üç haftalık kan glukoz ölçümlerindeki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamakla beraber, SO uygulamasının kan glukoz düzeyinde düşüşe sebep olduğu söylenebilir.



Şekil 15. Deneysel gruplara ait biyokimyasal parametre düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. * $p < 0.05$: Kontrol grubuna göre anlamlı, # $p < 0.05$: DM grubuna göre anlamlı.

Biyokimyasal parametrelere ait veriler şekil 15'teki gibidir. Karaciğer harabiyet göstergelerinden ALT enzimi ile Glukoz düzeyleri Kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi gruplarından DM+SO-400 mg/kg

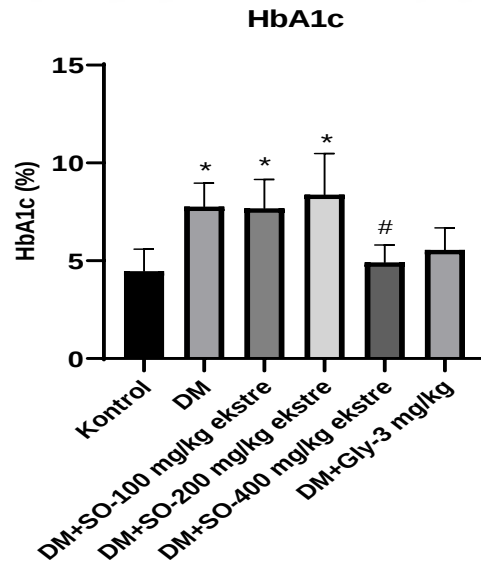
ekstre ve DM+Gly-3 mg/kg gruplarındaki ALT ve Glukoz düzeylerindeki düşüş ise DM grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (Şekil 15 A ve I).

DM ve DM+SO-200 mg/kg gruplarında ölçülen AST ve LDH düzeyleri Kontrol grubuna kıyasla artışları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 15 B ve C). Diğer yandan DM+SO-100 mg/kg, DM+SO-400 mg/kg ve DM+Gly-3 mg/kg gruplarında ölçülen LDH düzeylerindeki düşüş DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 15 C).

DM grubu Kolesterol ve Üre düzeylerindeki artış diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 15 D ve H).

HDL_c düzeyi SO ile tedavi edilen 200, 400 mg/kg ekstre grupları ve Gly-3 gruplarındaki düşüş Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 15 F).

TRIG ve Kreatinin düzeylerindeki değişim ise belirlenen grup kıyaslanmasında istatistiksel fark bulunmadı (Şekil 15 E ve G).



Şekil 16. Deneysel gruplara ait HbA1c düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. * $p<0.05$: Kontrol grubuna göre anlamlı, # $p<0.05$: DM grubuna göre anlamlı.

Karaciğer dokusuna ait MDA ve GSH içerikleri ile antioksidan enzim aktiviteleri Tablo 10'da verilmiştir. DM grubu karaciğer MDA içeriği DM+SO-100 mg/kg grubu hariç diğer tüm gruplara kıyasla artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. DM ve DM+SO-100 mg/kg gruplarının karaciğer GSH düzeyleri Kontrol grubuna göre azalışları anlamlı bulunurken, DM+SO-400 mg/kg ve DM+Gly-3 gruplarında karaciğer GSH düzeylerindeki artışlar DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Karaciğer GST enzim aktivitesi belirlenen grup kıyaslanmasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmazken, DM+SO-400 mg/kg grubu karaciğer GR aktivitesindeki artış DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kontrol grubu Karaciğer CAT aktivitesindeki artış DM+SO-100 mg/kg grubu hariç diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu. DM+Gly-3 grubu karaciğer GPx enzim aktivitesi DM grubuna göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Böbrek dokusuna ait MDA ve GSH içerikleri ile antioksidan enzim aktiviteleri Tablo 10'da verilmiştir. DM grubu böbrek dokusunda ölçülen MDA içeriğindeki artış diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. GSH, GST, GR ve CAT'ta ise belirlenen grup kıyaslamasında istatistiksel açıdan fark bulunmadı. DM+SO-100 mg/kg grubu hariç diğer grupların böbrek dokusu SOD enzim aktiviteleri Kontrol grubuna göre azalışları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Benzer şekilde, böbrek dokusu DM+SO-200 mg/kg ve DM+Gly-3 mg/kg grupların GPx enzim aktiviteleri Kontrol değerlerine çekilirken diğer grupların GPx enzim aktiviteleri Kontrol grubuna göre düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Pankreas dokusuna ait MDA ve GSH içerikleri ile antioksidan enzim aktiviteleri Tablo 10'da verilmiştir. Pankreas dokusunun Kontrol grubunda MDA içeriği DM ve DM+SO-100 mg/kg gruplarına göre artışı istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken, DM+SO-400 mg/kg ekstre grubu MDA içeriği ise DM grubuna göre azalışı istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. DM ve DM+SO-100 mg/kg gruplarının pankreas GSH düzeyi ve GST enzim aktiviteleri Kontrol grubuna kıyasla azalışları istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, bu parametrelerin DM+SO-400 mg/kg ekstre grubundaki artışları ise DM grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. DM+SO-200 mg/kg grubu GR aktivitesi Kontrol grubuna kıyasla azalması istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Pankreas CAT aktivitesi DM ve DM+SO-100 mg/kg gruplarındaki düşüş Kontrol

grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Diğer yandan DM+SO-200 mg/kg, DM+SO-400 mg/kg ve DM+Gly-3 mg/kg grupların CAT aktivitesindeki artışlar DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Pankreas SOD enzim aktivitesi DM+SO-200 mg/kg ve DM+Gly-3 mg/kg gruplarında Kontrol ve DM gruplarına göre artışları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Benzer şekilde, DM+Gly-3 mg/kg grubu GPx enzim aktivitesindeki artış Kontrol ve DM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Tablo 10. *S. orientalis* bitki ekstresinin çeşitli dokulardaki MDA, GSH içerikleri ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi

Doku	Enzim	Kontrol	DM	DM+SO-100 mg/kg ekstre	DM+SO-200 mg/kg ekstre	DM+SO-400 mg/kg ekstre	DM+Gly-3 mg/kg
Karaciğer	MDA (nmol/g prt)	0.61 ± 0.06	0.76 ± 0.05*	0.70 ± 0.11	0.60 ± 0.05 [#]	0.63 ± 0.06 [#]	0.62 ± 0.04 [#]
	GSH (GSH/mg prt)	92.56 ± 3.87	76.79 ± 7.49*	84.93 ± 4.47	80.65 ± 3.33*	85.23 ± 3.61 [#]	85.07 ± 2.43 [#]
	GST (nmol/g prt)	155.83 ± 5.74	144.14 ± 5.96	148 ± 17.05	138.79 ± 8.73	162.24 ± 14.07	149.61 ± 9.85
	GR (U/g prt)	2.90 ± 0.17	2.61 ± 0.26	2.83 ± 0.18	2.83 ± 0.30	3.13 ± 0.26 [#]	2.87 ± 0.13
	CAT (nmol/g prt)	24.71 ± 2.99	20.93 ± 1.49*	22.42 ± 2.46	19.39 ± 2.41*	20.65 ± 1.59*	21.01 ± 1.58*
	SOD (pg/mg prt)	266.19±39.89	223.40±36.81	233.83±20.48	295.97±38.05	246.97±38.05	226.47±18.50
	GPx (IU/mg prt)	34.24±9.03	29.3±1.03	36.02±5.54	32.4±7.80	38.13±4.51	44.08±8.35 [#]
Böbrek	MDA (nmol/g prt)	1.21 ± 0.14	1.63 ± 0.10*	1.32 ± 0.19 [#]	1.39 ± 0.07 [#]	1.27 ± 0.11 [#]	1.27 ± 0.11 [#]
	GSH (GSH/mg prt)	119.81 ± 15.81	108.04 ± 9.00	115.47 ± 6.93	119.46 ± 3.62	119.48 ± 7.38	119.52 ± 8.16
	GST (nmol/g prt)	19.01 ± 0.81	17.55 ± 2.33	18.16 ± 3.08	20.40 ± 2.97	20.15 ± 0.72	17.20 ± 1.81
	GR (U/g prt)	6.38 ± 0.43	5.73 ± 0.45	6.23 ± 0.67	6.11 ± 0.56	5.77 ± 0.48	6.07 ± 0.50
	CAT (nmol/g prt)	12.86 ± 1.28	10.73 ± 1.45	10.79 ± 1.40	11.80 ± 1.03	11.25 ± 1.24	11.67 ± 0.82
	SOD (pg/mg prt)	678.68±135.98	429.74±54.74*	455.23±74.70*	523.70±75.03	473.36±59.65*	459.07±101.30*
	GPx (IU/mg prt)	105.83±33.74	61.66±9.03*	63.02±9.57*	75.08±13.07	68.20±9.65*	82.25±16.10
Pankreas	MDA (nmol/g prt)	3.09 ± 0.39	4.45 ± 0.46*	4.30 ± 0.36*	4.10 ± 0.77	3.21 ± 0.97 [#]	3.40 ± 0.64
	GSH (GSH/mg prt)	173.13 ± 24.41	89.98 ± 22.58*	105.50 ± 17.71*	129.66 ± 30.52	149.49 ± 33.71 [#]	131.23 ± 22.51
	GST (nmol/g prt)	25.69 ± 5.62	15.61 ± 2.98*	13.43 ± 2.26*	23.32 ± 7.15	28.32 ± 6.25 [#]	21.25 ± 3.47
	GR (U/g prt)	7.08 ± 1.11	5.33 ± 1.21	7.08 ± 1.21	5.18 ± 1.13*	6.54 ± 0.71	5.94 ± 1.00
	CAT (nmol/g prt)	4.27 ± 0.37	1.71 ± 0.29*	2.22 ± 0.31*	3.82 ± 0.42 [#]	3.84 ± 0.75 [#]	3.66 ± 0.67 [#]
	SOD (pg/mg prt)	1509.41±265.89	1485.23±364.14	2184.34±617.79	2501.17±604.41* [#]	1712.02±419.02	2575.47±589.65* [#]
	GPx (IU/mg prt)	185.71±36.66	180.51±18.99	239.86±76.32	282.10±58.77	230.63±61.19	324.05±84.96* [#]

DM; Diabetes mellitus, DM+SO-100 mg/kg ekstre; Diabetes mellitus + *Scutellaria orientalis*-100 mg/kg ekstre, DM+SO-200 mg/kg ekstre; Diabetes mellitus + *Scutellaria orientalis*-200 mg/kg ekstre, DM+SO-400 mg/kg ekstre; Diabetes mellitus + *Scutellaria orientalis*-400 mg/kg ekstre, DM+Gly-3 mg/kg; Diabetes mellitus + Glibenklamid 3 mg/kg. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. * p<0.05: Kontrol grubuna göre anlamlı, [#] p<0.05: DM grubuna göre anlamlı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın *in vitro* kısmında kasıde bitkisinin (*Scutellaria orientalis* subsp. *pichleri*) toprak üstü kısımlarından elde edilen etanolik liyofilize ekstresinde toplam fenolik miktarı, toplam falovonid miktarı ve LC-MS/MS ile fitokimyasal içeriğin nicel olarak belirlenmesi amaçlandı. Çalışmanın *in vivo* kısmında ise STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda *S. orientalis* ekstresinin etkileri antidiyabetik, antioksidan ve antihiprelipidemik bulgular ışığında ortaya konulması amaçlandı.

Modern tıp ve ilaç endüstrisindeki gelişmelerle beraber zenginleşen tedavi yöntemlerine rağmen DM'deki artışın önlenememesi, artan maliyetler ve ilaçların yan etkileri gibi sebeplerle insanların diyabetle mücadelede alternatif yaklaşımlara yönelmesine sebep olmuştur. Bu alanlardan birisi de doğal bitkisel ürünlerdir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyada tıbbi amaçlı kullanılan 21.000 bitkiden 400'den fazlasının diyabet ve diaybetin komplikasyonlarını engellemede tedavi amaçlı kullanıldığını bildirmiştir (Kumar ve ark., 2021).

Lamiaceae familyasında yer alan *Scutellaria* cinsi yaklaşık 360 tür ile temsil edilmektedir (Gharari ve ark., 2022). *Scutellaria* türlerinin antikanser, anti proliferatif, anti-lösemik, kabızlık önleyici, yara iyileştirici ve oksidatif strese karşı etkileri olduğu bilinmektedir (Özmen ve ark., 2010; Gharari ve ark., 2022). *Scutellaria baicalensis* etanolik kök ekstresinin antioksidan ve antidiyabetik etkisi olduğu rapor edilmiştir (Waisundara ve ark., 2008). *S. orientalis* bitki kök ekstresinin terpenoid (karyofilen, gualol ve gama-gurjunen) ve flavonoit (vagonin, baicalin ve apigenin-7-glukosidaz) bileşikler bakımından zengin olduğu ve bu bileşiklerin insan kolon hücre hatlarında umut verici antikanser aktivitesine sahip olduğu vurgulanmıştır (Gharari ve ark., 2022). *Scutellaria orientalis* subsp. *pichleri* bitkisinin farklı kısımlarının halk arasında analjezik, kanser ve hemoroit tedavisinde kullanımı olduğu bildirilmiştir (Mükemre et al., 2015). *S. orientalis* bitkisinin diyabet tedavisi için umut verici farmasötik ajanlara hizmet edebileceği vurgulanmıştır (Dalar, 2018). *S. orienatlis*'in yüksek flavon ve total fenolik içeriğine, fosfomolibden, DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP ve Metal şelatlama aktiviteleri ile antioksidan etkiye ve AChE, BChE, tirozinaz ve α -amilaz enzim inhibisyon özelliklerine göre *in vitro* antidiyabetik potansiyeline sahip olabileceği rapor

edilmiştir (Zengin ve ark., 2019). Ancak bu bitkiye ait *in vivo* antidiyabetik çalışmalara rastlanmadı. Bu çalışmada ilk önce *S. orientalis* subsp. *pichleri* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen etanolik liyofilize ekstresinde LC-MS/MS ile içerik analizleri yapılarak bitkideki apigenin, luteolin, kinik asit, kozmosiin ve epigallocateşin gibi antidiyabetik potansiyeli yüksek major ürünlerin varlığı belirlendi (Tablo 9 ve Şekil 12). Daha sonra STZ ile diyabet modeli oluşturulan ratlarda bitkinin antidiyabetik ve antioksidan etkisi kan serumu, karaciğer, böbrek ve pankreas dokularındaki iyileştirici etkisi araştırıldı.

Kilo kaybı diyabet hastalarında gözlemlenen en belirgin septomlardan biridir. Şekil 13'te görüldüğü gibi Kontrol grubu dışındaki STZ ile diyabet oluşturulan grupların 7. günündeki CHA'da ağırlık kaybına sebep olduğu görülmektedir. Diğer yandan *Scutellaria orientalis* ekstresi (SOE) ve Glibenklamid ile tedavi edilen grupların 21. gündeki CHA değerlerinde artışa neden oldu. Bu durum SOE'nin DM komplikasyonlarını azaltarak CHA artışında etkili olabileceğini göstermektedir. Bulgularımız daha önce STZ ile diyabet oluşturulan rat modellerindeki CHA değişimleriyle uyumlu olduğunu göstermektedir (Duman ve ark., 2022; Agirman ve ark., 2022).

DM'nin en belirgin özelliği dolaşımdaki kan glukoz düzeyinin normal referans aralığın üstünde olmasıdır. Açlık kan glukoz düzeyi 126 mg/dL üzerinde ise birey DM olarak kabul edilir. Şekil 14'te görüldüğü gibi kuyruk kanından ölçülen haftalık kan glukoz düzeylerinde istatistiksel olarak fark bulunmazken, serum glukoz düzeyinin SOE-400 mg/kg ve Glibenklamid gruplarında ise DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (Şekil 15 I). Benzer Şekilde HbA1c düzeyi DM grubuna kıyasla SOE-400 mg/kg grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdi (Şekil 16). Ayrıca, karaciğer ve böbrek hasarı belirteçlerinden ALT, LDH, üre ve lipid profili parametrelerinden kolesterol değerleri üç haftalık SOE-400 mg/kg ve glibenklamid tedavisi sonucu DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı iyileştirme gösterdi (Şekil 15 A, C, D ve H). Elde edilen sonuçlara göre, SOE dozları ve glibenklamidin hem kan glukoz ve HbA1c düzeylerini düşürdüğü hemde karaciğer ve böbrek hasar biyobelirteçleri üzerinde iyileştirici etkiye sahaip olduğu belirlendi. Bu olumlu etkilerin kesin sebebi belli olmamakla beraber bitki ekstresinde bulunan fenolik, flavonoit (Tablo

8), apigenin, luteolin, kinik asit, kozmosiin ve epigallokateşin (Tablo 9 ve Şekil 12) fitokimyasal bileşiklerin ve/veya oral antidiyabetik ilacın (glibenklamid) uyarıcı aktivitesine bağlı olabilir. Daha önce STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda da apigenin, luteolin, kinik asit, kozmosiin ve epigallokateşin fitokimyasal bileşiklerin antidiyabetik, hepatoprotektif ve nefroprotektif etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir (Duman ve ark., 2022; Ding ve ark., 2019; Kotha ve ark., 2017).

Hücrel redüksiyon oksidasyonu dengesizliğinin oksidatif strese ve ardından β -hücre disfonksiyonu ve insülin direncinde yer alan belirli sinyal yollarını etkileyerek diyabet ve ilgili komplikasyonların ortaya çıkmasına ve gelişmesine yol açmaktadır (Zhang ve ark., 2020). Reaktif oksit türleri, diyabet sürecinde yer alan belirli proteinleri ve lipitleri etkileyerek protein oksidasyonuna ve lipit peroksidasyonuna sebep olur. Dahası, oksidatif stres sonucu artan serbest radikaller proteinlere, karbonhidratlara, yağlara ve nükleik asitlere saldırarak antioksidan savunma sistemi enzim aktivitelerinde düşüşe ve lipit peroksidasyonun artışına sebep olur. Yapılan pekçok çalışmada lipit peroksidasyonun majör ürünü olan MDA'nın diyabetik ratlarda önemli oranda yükseldiği GSH seviyesi ve antioksidan enzim aktivite düzeylerinde ise düştüğü belirlenmiştir (Dogan ve ark., 2015; Hanalp ve ark., 2022). Diyabetik ratlarda serbest radikallerin doymamış yağ asitlerin çift bağlarına saldırarak MDA artışına neden olmaktadır (Duman ve ark., 2022; Doğan ve Çelik, 2016). Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, MDA içeriğinin karaciğer, böbrek ve pankreas DM grubunda arttığı görülürken, karaciğer MDA düzeyinin SO-200 mg/kg, SO-400 mg/kg ve Gly gruplarında DM grubuna kıyasla önemli oranda düştüğü belirlendi. Benzer şekilde böbrek dokusunun tüm tedavi grupları ile pankreasın SO-400 mg/kg grubunun MDA düzeyi DM grubuna kıyasla düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 10). *Scutellaria* türleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda, bu cinse ait türlerin zengin fenolik ve flavonoit içeriğine sahip oldukları ve lipit peroksidasyonunu baskılayıcı/engelleme etkilerinin olduğu vurgulanmıştır (Shang ve ark., 2010; Bardakçi ve ark., 2015; Zengin ve ark., 2019).

Glutasyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin) oksidatif stresin etkilerini azaltmada anahtar rol oynayan önemli bir hücre içi non-enzimatik antioksidandır (Wu ve ark., 2004; Lutchmansingh ve ark., 2018). STZ ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda GSH

içeriğinin karaciğer, böbrek ve pankreas dokularında düştüğü rapor edilmiştir (Yaghmaie ve ark., 2011). Çalışmada elde edilen bulgulara göre karaciğer ve pankreas dokularındaki GSH düzeyi DM grubunda Kontrol ve SO ile tedavi edilen gruplara (genelde yüksek dozlar) kıyasla genel olarak düşüş gösterdiği belirlendi (Tablo 10). Bu durum SO bitki ekstresinin antioksidan etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini azaltan veya ortadan kaldıran önemli bileşiklerdir. Enzimatik (SOD, GPx, CAT, GST, GR vb.) ve non enzimatik (glutatyon, vitamin ve mineral) olarak görev yapan pek çok önemli antioksidan bileşik vardır. DM kaynaklı artan oksidatif stres ile antioksidan savunma sisteminin düşüşü pek çok çalışmada vurgulanmıştır (Scott ve King, 2004; Nasri ve ark., 2015; Doğan ve Çelik, 2016). Alloxan ile diyabet oluşturulan ratlarda artan serbest radikaller ve lipit peroksidasyonunun karaciğer, böbrek ve pankreas dokularında ölçülen CAT, GPx ve SOD antioksidan enzim aktivitelerinde önemli düşüşe neden olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada STZ ile diyabet oluşturulan ratların karaciğer, böbrek ve pankreas dokularında ölçülen GST ve CAT enzim aktivitelerinin kontrol, DM ve tedavi gruplarında farklı dalgalanmalara sebep olduğu gösterilmiştir (Duman ve ark., 2022). Benzer şekilde çalışmamızdaki antioksidan enzim aktivitelerinin genel olarak DM grubunda düşüş gösterdiği tedavi gruplarında ise dokudan dokuya farklı dalgalanmalara sebep olduğu görülmüştür (Tablo 10). Dokulardaki bu dalgalanmaların sebebi kesin olmamakla beraber dokuların farklı fizyolojik özelliklerine, doz miktarına ve deney süresine bağlı olabilir.

Çalışma kapsamında veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, STZ ile DM modeli oluşturulan ratlarda *Scutellaria orientalis* toprak üstü etanolik liyofilize ekstresinin antihiperglisemik, antioksidan ve lipit peroksidasyonu düşürücü etkisinin olabileceği belirlendi. LC-MS/MS ile bitki ekstresinde apigenin, luteolin, kinik asit, kozmosiin ve epigallocateşin gibi antidiyabetik potansiyeli yüksek major bileşiklerin varlığı tespit edildi. Bu veriler ışığında *Scutellaria orientalis*'in belirlenen dozlarda kullanımının diyabet ve diyabet komplikasyonlarını hafifletici/engelleleyici ve antioksidan rolünün olabileceği sonucuna varılmıştır.

Scutellaria orientalis bitkisinden daha fazla bileşiklerin izole edilmesi (i), izole edilecek bileşiklerin DM ve DM ile ilişkili komplikasyonların önlenmesindeki etkileri

in vivo çalışmalarla desteklenmesi (ii), gen ekspresyonu, hücre kültürü ve histopatolojik çalışmaların yapılması (iii) neri olarak sunulabilir.



KAYNAKLAR

- Aebi H. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis: Elsevier. 1974;673-84.
- Agirman E, Celik I, Dogan A. Consumption of the Syrian mesquite plant (*Prosopis farcta*) fruit and seed lyophilized extracts may have both protective and toxic effects in STZ-induced diabetic rats. Arch Physiol Biochem. 2022;128(4):887-96.
- Ahmad FK, He Z, King GL. Molecular targets of diabetic cardiovascular complications. Curr drug targets. 2005;6(4):487-94.
- Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maidi I. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. Can J Diabetes. 2015;39(1):44-9.
- Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. Saudi Pharm J. 2016;24(5):547-53.
- Bardakci H, Skaltsa H, Milosevic-Ifantis T, Lazari D, Hadjipavlou-Litina D, Yeşilada E, Kırmızıbekmez H, ve ark. Antioxidant activities of several *Scutellaria* taxa and bioactive phytoconstituents from *Scutellaria hastifolia* L. Ind Crops Prod. 2015;77:196-203.
- Baynes J, Dominiczak MH. Medical biochemistry. Elsevier Health Sciences. 2009.
- Beutler E. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med. 1963;61:882-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-54.
- Bron M, Marynchenko M, Yang H, Yu AP, Wu EQ. Hypoglycemia, treatment discontinuation, and costs in patients with type 2 diabetes mellitus on oral antidiabetic drugs. Postgrad Med. 2012;124(1):124-32.
- Buege JA, Aust SD, Abelson J, Simon MI, Verdine GL, Pyle AM, ve ark. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology. U.S.A. 1978;302-10.
- Caffes N, Kurland DB, Gerzanich V, Simard JM. (2015). Glibenclamide for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. Int J Mol Sci. 2015;16(3):4973–84.

- Cakilcioglu U, Turkoglu I. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). J Ethnopharmacol. 2010;132(1):165-75.
- Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J Biol Chem. 1975;250(14):5475-80.
- Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi VS, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, ve ark. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. Front Endocrinol. 2017;8:1-12.
- Chiu CM, Muddiman DC. What is Mass Spectrometry?, American Society for Mass Spectrometry. 2008. <http://www.asms.org/whatisms>.
- Çakılciöğlü U, Türkoğlu İ. Plants used for hemorrhoid treatment in Elazığ central district. In: Turgut K, Onus AN, Máthé A, editors. I International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs; 30 April 2009; Antalya, Turkey; 2009. p.89-96.
- Dalar A. Plant taxa used in the treatment of diabetes in Van Province, Turkey. Int J Second Metab. 2018;5(3):171-85.
- Ding Q, Zheng W, Zhang B, Chen X, Zhang J, Pang X, ve ark. Comparison of hypoglycemic effects of ripened pu-erh tea and raw pu-erh tea in streptozotocin-induced diabetic rats. RSC Adv. 2019;9(6):2967-77.
- Dogan A, Celik I, Kaya MS. Antidiabetic properties of lyophilized extract of acorn (*Quercus brantii* Lindl.) on experimentally STZ-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2015;176:243-51.
- Dogan A, Dalar A, Sadullahoglu C, Battal A, Uzun Y, Celik I, ve ark. Investigation of the protective effects of horse mushroom (*Agaricus arvensis* Schaeff.) against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. Mol Biol Rep. 2018;45(5):787-97.
- Doğan A, Çelik İ. Healing effects of sumac (*Rhus coriaria*) in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharm Biol. 2016;54(10):2092-102.
- Duman KE, Dogan A, Kaptaner B. Ameliorative role of *Cyanus depressus* (M. Bieb.) Soják plant extract against diabetes-associated oxidative-stress-induced liver, kidney, and pancreas damage in rats. J Food Biochem. 2022;46(10):e14314.

- Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Medicine*. 2019;47(1):22-7.
- Ganzer M. Quality control of herbal medicines by capillary electrophoresis: Potential, requirements and applications. *Electrophoresis*. 2008;29(17):3489-503.
- Gharari Z, Aghajanzadeh M, Sharafi A. *Scutellaria orientalis* subsp. Bornmuelleri: phytochemical composition and biological activities. *Nat Prod Res*. 2022;36(5):1385-90.
- Gharari Z, Bagheri K, Sharafi A. Chemical composition of the essential oil from *Scutellaria orientalis* L. subsp. virens (Boiss. & Kotschy) JR Edm., grown in Iran: Gas Chromatography/Mass Spectrometry Data. *J Biosci Biotechnol*. 2021;10(1):25-9.
- Gotti R. Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;55(4):775-801.
- Göçer H, Akıncıoğlu A, Öztaşkın N, Göksu S, Gülçin İ. Synthesis, Antioxidant, and Antiacetylcholinesterase Activities of Sulfonamide Derivatives of Dopamine-R elated Compounds. *Arch Pharm*. 2013;346(11):783-92.
- Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol*. 2012;86(3):345-91.
- Gülçin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch Toxicol*. 2020; 94(3): 651-715.
- Hanalp HC, Dogan A, Saygi TK, Donmez F, Battal A. Exploring phytochemical constituents of *Achillea arabica* Kotschy. ethanolic flower extract by LC-MS/MS and its possible antioxidant and antidiabetic effects in diabetic rats. *Z Naturforsch C*. 2022. DOI: org/10.1515/znc-2022-0082
- Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab. Res. Rev*. 2002;18(2):10-5.
- Huang X, Kong L, Li X, Chen X, Guo M, Zou H, ve ark. Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines. *J Chromatogr B*. 2004;812(1-2):71-84.
- Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018;108:656-62.

- Isaji, M. Sodium-glucose cotransporter inhibitors for diabetes. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007;8(4):285-92.
- Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica. Science and Technology Press of Shanghai, Shanghai (in Chinese). 1977.
- Kotha P, Badri KR, Nagalapuram R, Allagadda R, Chippada AR. Anti-diabetic potential of the leaves of *Anisomeles malabarica* in streptozotocin induced diabetic rats. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(4):1689-702.
- Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents. *Drugs*. 2005;65(3):385-411.
- Kumar S, Mittal A, Babu D, Mittal A. Herbal medicines for diabetes management and its secondary complications. *Curr Diabetes Rev*. 2021;17(4):437-56.
- Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn Rev*. 2011;5(9):19-29.
- LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and molecular mechanisms of metformin action. *Endocr Rev*. 2021;42(1):77-96.
- Li X, Lee YJ, Kim HY, Tan R, Park MC, Kang DG, Lee HS, ve ark. Beneficial effects of *Scutellaria baicalensis* on penile erection in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Chin. Med*. 2016;44(2):305-20.
- Liu SZ, Deng YX, Chen B, Zhang XJ, Shi QZ, Qiu XM, ve ark. Antihyperglycemic effect of the traditional Chinese scutellaria–coptis herb couple and its main components in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(2):490-8.
- Lutchmansingh FK, Hsu JW, Bennett FI, Badaloo AV, McFarlane-Anderson N, Gordon-Strachan GM, Boyne MS, ve ark. Glutathione metabolism in type 2 diabetes and its relationship with microvascular complications and glycemia. *PloS one*. 2018;13(6):e0198626.
- Madaan T, Akhtar M, Najmi AK. (2016). Sodium glucose CoTransporter 2 (SGLT2) inhibitors: Current status and future perspective. *Eur J Pharm Sci*. 2016;93:244-52.
- Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Meth Enzymol*. 1981;77:231-5.

- McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: back to the future or into extinction?. *Phytochemistry*. 2007;68(14):2015-22.
- Mehanna, A. Antidiabetic agents: Past, present and future. *Future Med Chem*. 2013;5:411-30.
- Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 2013;494:256-60.
- Mohan Y, Jesuthankaraj GN, Ramasamy Thangavelu N. Antidiabetic and antioxidant properties of *Triticum aestivum* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Adv Pharmacol Sci*. 2013;2013:1-9.
- Mükemre M, Behçet L, Çakılcıoğlu U. Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Çatak (Van-Turkey). *J Ethnopharmacol*. 2015;166:361-74.
- Nasri H, Shirzad H, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M. Antioxidant plants and diabetes mellitus. *J Res Med Sci*. 2015;20(5):491-502.
- Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*. 2019;178:687-704.
- Özlür Başer B, Yangin M, Sarıdaş ES. Makine öğrenmesi teknikleriyle diyabet hastalığının sınıflandırılması. *J Nat Appl Sci*. 2021;25(1):112-20.
- Özmen A, Madlener S, Bauer S, Krasteva S, Vonach C, Giessrigl B, ve ark. In vitro anti-leukemic activity of the ethno-pharmacological plant *Scutellaria orientalis* ssp. *carica* endemic to western Turkey. *Phytomedicine*. 2010;17(1):55-62.
- Papatheodorou K, Papanas N, Banach M, Papazoglou D, Edmonds M. Complications of diabetes 2016. *J Diabetes Res*. 2016;2016:1-3.
- Prattichizzo F, De Nigris V, Mancuso E, Spiga R, Giuliani A, Matakchione G, Ceriello A, ve ark. Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages. *Redox Biol*. 2018;15:170-81.
- Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51(3):368-76.

Rabasa-Lhoret R, Chiasson JL. α -Glucosidase inhibitors. International textbook of diabetes mellitus. 2003.

Rahimi BV, Askari VR, Hosseinzadeh H. Promising influences of *Scutellaria baicalensis* and its two active constituents, baicalin, and baicalein, against metabolic syndrome: A review. *Phytother Res*. 2021;35(7):3558-74.

Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(5):567-75.

Rehman K, Akash MSH. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. *J Cell Biochem*. 2017;118(11):3577-85.

Richter B, Bandeira-Echtler E, Bergerhoff K, Lerch C. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev*. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006739.pub2>

Scott JA, King GL. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1031(1):204-13.

Shang X, He X, Li M, Zhang R, Fan P, Jia Z, ve ark. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol*. 2010;128(2): 279-313.

Shen J, Li P, Liu S, Liu Q, Li Y, Sun Y, ve ark. Traditional uses, ten-years research progress on phytochemistry and pharmacology, and clinical studies of the genus *Scutellaria*. *J Ethnopharmacol*. 2021;265:1-23.

Sherma J. Planar chromatography. *Anal Chem*. 2010;82(12):4895-910.

Singh VP. An overview on anti diabetic drugs and development. *Sci Technol J*. 2016;4(2):113-23.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144-158.

Snyder RW, Berns JS. Use of insulin and oral hypoglycemic medications in patients with diabetes mellitus and advanced kidney disease. *Semin Dial*. 2004;17:365-70.

- Song KH, Lee SH, Kim BY, Park AY, Kim JY. Extracts of *Scutellaria baicalensis* reduced body weight and blood triglyceride in db/db mice. *Phytother Res.* 2013;27(2):244-50.
- Sun B, Luo Z, Zhou J. Comprehensive elaboration of glycemic variability in diabetic macrovascular and microvascular complications. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20(1):1-13.
- Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, ve ark. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:1-13.
- Türkoğlu S. Determination of antiradical capacity of extracts *Scutellaria orientalis* L. subsp. *bicolor* (hochst.) edmondson. *Ecol Life Sci.* 2010;5(3):195-202.
- Vogeser M, Kirchhoff F. Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. *Clin Biochem.* 2011;44(1):4-13.
- Waisundara VY, Hsu A, Huang D, Tan BKH. *Scutellaria baicalensis* enhances the anti-diabetic activity of metformin in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Am J Chin Med.* 2008;36(03):517-40.
- Wang Y, Hu T, Wei J, Yin X, Gao Z, Li, H. Inhibitory activities of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on amyloid aggregation related to type 2 diabetes and the possible structural requirements for polyphenol in inhibiting the nucleation phase of hIAPP aggregation. *Int J Biol Macromol.* 2022;215:531-40.
- Watson JT, Sparkman OD. Introduction of Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. (4th Eds), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 978-0-470-51634-8, West Sussex, England. 2007.
- Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res.* 1998;37(2):99-105.
- World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation. 2006.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-92.

- Wu PC, Wu VC, Lin CJ, Pan CF, Chen CY, Huang TM, ve ark. Kidney Consortium. Meglitinides increase the risk of hypoglycemia in diabetic patients with advanced chronic kidney disease: a nationwide, population-based study. *Oncotarget*. 2017;8(44):78086–95.
- Xie JT, Wang CZ, Li XL, Ni M, Fishbein A, Yuan CS, ve ark. Anti-diabetic effect of American ginseng may not be linked to antioxidant activity: comparison between American ginseng and *Scutellaria baicalensis* using an ob/ob mice model. *Fitoterapia*. 2009;80(5):306-11.
- Yaghmaie P, Heydarian E, Poorbahman N. The regenerative effects of *Thymus vulgaris* extract on beta cells of pancreas of streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *Med Sci J Islamic Azad Univ*. 2011;21(3):162-7.
- Yılmaz G, Çiçek M, Demirci B, Başer KHC. Essential oil compositions of subspecies of *Scutellaria brevibracteata* Stapf from Turkey. *J Essent Oil Res*. 2019;31(4):255-62.
- Yilmaz MA. Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Ind Crops Prod*. 2020;149:1-13.
- Yingrui W, Zheng L, Guoyan L, Hongjie W. Research progress of active ingredients of *Scutellaria baicalensis* in the treatment of type 2 diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother*. 2022;148:1-11.
- Zengin G, Llorent-Martínez EJ, Molina-García L, Fernández-de Córdova ML, Aktumsek A, Uysal S, ve ark. Chemical profile, antioxidant, and enzyme inhibitory properties of two *Scutellaria* species: *S. orientalis* L. and *S. salviifolia* Benth. *J Pharm Pharmacol*. 2019;71(2):270-80.
- Zhang B, Yue R, Chen Y, Huang X, Yang M, Shui J, ve ark. The herbal medicine scutellaria-coptis alleviates intestinal mucosal barrier damage in diabetic rats by inhibiting inflammation and modulating the gut microbiota. *Evid Based Complement Altern Med*. 2020;2020:1-17.
- Zhang CH, Sheng JQ, Sarsaiya S, Shu FX, Liu TT, Tu XY, ve ark. The anti-diabetic activities, gut microbiota composition, the anti-inflammatory effects of *Scutellaria*–

coptis herb couple against insulin resistance-model of diabetes involving the toll-like receptor 4 signaling pathway. J Ethnopharmacol. 2019;237:202-14.

Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y, ve ark. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. Front Med.2020;14(5):583-600.

Zhou J, Luo Y, Kang X, Bian F, Liu D. The root extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi promotes β cell function and protects from apoptosis by inducing autophagy. J Ethnopharmacol. 2022;284:1-6.

Zhou, GC, Myers R, Chen YL. Role of AMPactivated protein kinase in mechanism of metformine action. J Clin Invest. 2001;108:1167-74.





T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



G19 –TEZ ORJİNALLİK RAPORU

**Tez Başlığı /
Konusu**

Kaside (*Scutellaria orientalis* L. subsp. pichleri) Bitkisi Etanolik Ekstresinin LC-MS/MS ile İçerik Analizinin Belirlenmesi ve Diyabetik Sıçanlarda Ekstrenin İyileştirici Etkilerinin Araştırılması

İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları

Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
4	2	21	5	32

İntihal taraması yapılan program
Turnitin

Taramanın yapıldığı tarih
27 /12/ 2022

Benzerlik oranı %
%16

***Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:**

- | | |
|--|--------------------------------|
| - Kabul ve onay sayfası hariç, | - Gereç ve yöntemler hariç, |
| - Teşekkür hariç, | - Kaynakça hariç, |
| - İçindekiler hariç, | - Alıntılar hariç, |
| - Simge ve kısaltmalar hariç, | - Tezden çıkan yayınlar hariç, |
| - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) | |

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına ilişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Mehmet Salih BAKAÇ

Öğrencinin Adı Soyadı	Mehmet Salih BAKAÇ
Anabilim Dalı	Temel Eczacılık Bilimleri
Öğrenci No	19930006030
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora

--	--