



**HARMİN İÇEREN TAŞIYICI SİSTEMLERİN
DİYABETİK RATLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Galip Mesut DEMİR

Eczacılık Biyokimya Ana Bilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU**

Doktora Tezi-2024



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**HARMİN İÇEREN TAŞIYICI SİSTEMLERİN
DİYABETİK RATLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Galip Mesut DEMİR

**Eczacılık Biyokimya Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU**

**ERZURUM
2024**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Diabetes Mellitus (DM) Tanımı	4
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. DM'nin Tanısı.....	6
2.1.3. Diyabetin Komplikasyonları.....	7
2.1.4. Diyabet Sınıflaması.....	8
2.1.4.1. Tip I Diabetes Mellitus	9
2.1.4.2. Tip II Diabetes Mellitus	10
2.1.4.3. Gestasyonel Diyabet (GDM)	11
2.1.4.4. Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet.....	12
2.2. Oksidatif Stres.....	12
2.2.1. Oksidatif Stres ve Diyabet İlişkisi	13
2.2.2. Serbest Radikaller	14
2.2.2.1. Serbest Radikal Türleri	15
2.2.2.2. Serbest Radikal Kaynakları	15
2.2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri	16

2.3. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemleri	16
2.3.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	17
2.3.2. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	17
2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	17
2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	19
2.4. Botanik Bilgiler.....	19
2.4.1. <i>Peganum harmala</i> L. (Üzerlik Otu).....	19
2.4.1.1. Farmakolojik Özellikleri.....	21
2.4.2. Harmin (HRM)	21
2.5. Nanoemülsiyonlar (NE).....	23
2.5.1. NE Kavramı ve Özellikleri	23
2.5.2. Nanoemülsiyonların Üstünlükleri.....	24
2.5.3. Nanoemülsiyonların Sakıncaları.....	25
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	26
3.2. Metot.....	27
3.2.1. HRM'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini.....	27
3.2.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrumu	28
3.2.1.2. UV Spektrumu	28
3.2.2. HRM'nin HPLC ile Miktar Tayini	28
3.2.2.1. HRM'ye Ait Kalibrasyon Doğrusu.....	28
3.2.2.2. Analitik Yöntem Geçerliliği	29
3.2.3. NE Formülasyonunun Hazırlanması.....	32

3.2.4. NE Formülasyonların Karakterizasyonu	33
3.2.4.1. Santrifüj Testi	33
3.2.4.2. Damlacık Büyüklüğü ve Dağılımının Tayini.....	33
3.2.4.3. Zeta Potansiyelin Belirlenmesi	33
3.2.4.4. Morfolojik Analiz	33
3.2.4.5. pH Tayini	34
3.2.4.6. FT-IR Analizi.....	34
3.2.4.7. NE formülasyonlarındaki HRM İçeriğinin Tayini.....	34
3.2.4.8. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışması.....	34
3.2.5. <i>İn Vivo</i> Çalışmalar	34
3.2.5.1. STZ-NA ile Diyabet Modeli Oluşturma	35
3.2.5.2. Deneysel Tasarım	36
3.2.5.3. HRM ve HRM-NE'nin Sıçanlara Uygulanması, Numunelerin Hazırlanması..	36
3.2.5.4. Sıçanların Kan Glukoz Seviyelerinin Belirlenmesi	37
3.2.5.5. Sıçanların Vücut Ağırlıklarının Belirlenmesi	37
3.2.6. Biyokimyasal Analiz.....	38
3.2.6.1. AST ve ALT Ölçümü	38
3.2.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini	38
3.2.6.3. Glutasyon (GSH) Tayini	40
3.2.6.4. Malondialdehit (MDA) Tayini.....	43
3.2.6.5. Protein Tayini	45
3.2.7. Histolojik Prosedür	46
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. HRM'nin Fizikokimyasal Özellikleri	48

4.1.1. HRM'nin FT-IR Spekturumu	48
4.1.2. HRM'nin UV Spekturumu.....	49
4.2. HRM'nin HPLC Yöntemiyle Miktar Tayini	49
4.2.1. HRM'ye ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi	49
4.2.2. Analitik Yöntemin Geçerlilik Bulguları	50
4.2.2.1. Doğrusallık.....	50
4.2.2.2. Doğruluk	51
4.2.2.3. Kesinlik.....	51
4.2.2.4. Saptanabilirlik (LOD) ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (LOQ).....	52
4.2.2.5. Özgüllük.....	52
4.2.2.6. Stabilitate	53
4.3. NE Formülasyonlarının Karakterizasyonu	53
4.3.1. Santrifüj Testi	53
4.3.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı (PDI) ve Zeta Potansiyel Ölçümü.....	54
4.3.3. Morfolojik Analiz	54
4.3.4. pH Tayini	55
4.3.5. FT-IR Analizi.....	56
4.3.6. NE formülasyonlarındaki Harmin İçeriğinin Tayini	56
4.3.7. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışması.....	56
4.4. HRM ve HRM-NE'nin Sıçanlar Üzerine Etkisi	57
4.4.1. Sıçanların Vücut Ağırlık Değişimleri	57
4.4.2. Kan Glukoz Seviyeleri.....	57
4.4.3. AST ve ALT Düzeyleri.....	63
4.4.4. SOD Aktiviteleri, GSH ve MDA Seviyeleri.....	67
4.5. Histolojik Bulgular	71

5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	84
KAYNAKLAR	86
EKLER	106
EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	106
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	107



TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU'na saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yardım ve desteklerini esirgemeyen ve her türlü imkânı sağlayan sayın Prof. Dr. Meltem Çetin'e, Prof. Dr. Nurcan KILIÇ BAYGUTALP'e, Prof. Dr. Yasin BAYIR'a, Dr. Öğr. Üyesi Afife Büşra UĞUR KAPLAN'a, Doç. Dr. Zerrin KUTLU'ya, Arş. Gör. Lale DUYSAK'a, Emrah ÖZÇELİK'e, Adem BÜLBÜL'e, Yasin SANCAR'a ve bu çalışmayı 10606 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen eşime ve oğluma teşekkür ederim.

Galip Mesut DEMİR

ÖZET

Harmin İçeren Taşıyıcı Sistemlerin Diyabetik Ratlar Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Yapılan bu çalışma, streptozotosin-nikotinamid (STZ-NA) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda Harmin (HRM) ve HRM içeren nanoemülsiyon (NE) formülasyonlarının diyabet üzerine etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik açıdan incelemek için tasarlanmıştır.

Materyal ve Metot: HRM ve HRM-NE'nin 5, 10 ve 15 mg/kg dozları verilen diyabetik sıçanlar 21 gün boyunca günlük tek doz sıvı halde oral uygulanmasıyla tedavi edildi. 21 gün sonunda sıçanların karaciğer doku örneklerinde SOD aktiviteleri, GSH ve MDA seviyeleri tespit edildi. Dokuların bir kısmında da histopatolojik çalışmalar yapıldı. Sıçanlardan alınan kanlarda AST, ALT ve glukoz seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Üç farklı dozlarda verilen HRM ve HRM-NE formülasyonlarının uygulamasından sonra, tedavi edilen diyabetik sıçanların GSH seviyeleri ile SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli bir artış, MDA, ALT ve AST seviyelerinde ise istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma belirlendi ($p<0.05$). Kan glukoz seviyelerinin HRM-NE uygulanan gruplarda diğer gruplara oranla düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Uygulanan HRM-NE gruplarında artan doza bağlı olarak diyabetik sıçanların AST ve ALT seviyelerinin düştüğü gözlemlendi ($p<0.05$). Histopatolojik bulgularda da, diyabetik sıçanların özellikle HRM-NE verilen gruplarında iyileşmenin meydana geldiği ve karaciğer morfolojisinin sağlıklı gruba ait görüntülere benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Sonuç: Sonuç olarak, HRM'nin antioksidan ve antidiyabetik etkisinin olduğu, diyabetik sıçanlara verilen aynı dozlardaki HRM'ye nazaran biyoyararlanımı artırılarak verilen HRM-NE'nin daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, diyabet, harmin, nanoemülsiyon, nikotinamid streptozotosin.

ABSTRACT

Effects of Harmin-Containing Delivery Systems on Diabetic Rats

Aim: This study was designed to investigate the biochemical and histopathological effects of Harmin (HRM) and HRM-containing nanoemulsion (NE) formulations on diabetes in streptozotocin-nicotinamide (STZ-NA) induced diabetic rats.

Material and method: Diabetic rats given 5, 10 and 15 mg/kg doses of HRM and HRM-NE were treated with a single daily oral administration of liquid form for 21 days. At the end of 21 days, SOD activities, GSH and MDA levels were determined in liver tissue samples of rats. Histopathologic studies were also performed in some of the tissues. AST, ALT and glucose levels were measured in blood samples taken from rats.

Results: After the administration of HRM and HRM-NE formulations at three different doses, a statistically significant increase in GSH levels and SOD activities and a statistically significant decrease in MDA, ALT and AST levels were determined in the treated diabetic rats ($p < 0.05$). Blood glucose levels were found to be lower in HRM-NE treated groups compared to the other groups ($p < 0.05$). It was observed that AST and ALT levels of diabetic rats decreased in the HRM-NE groups depending on the increasing dose ($p < 0.05$). In histopathological findings, it was determined that improvement occurred especially in the HRM-NE groups of diabetic rats and liver morphology was similar to the images of the healthy group.

Conclusion: As a result, it was determined that HRM has antioxidant and antidiabetic effects and HRM-NE given by increasing bioavailability showed more antioxidant activity compared to the same doses of HRM given to diabetic rats.

Key Words: Antioxidant, diabetes, harmin, nanoemulsion, nicotinamide, streptozotocin.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	:	Alanin Aminotransferaz
APG	:	Açlık Plazma Glukozu
AST	:	Aspartat Aminotransferaz
ATADEM	:	Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
BAG	:	Bozulmuş açlık glukozu
BGT	:	Bozulmuş Glukoz Toleransı
B-NE	:	Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon
CAT	:	Katalaz
D-BNE	:	Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon
D- HRM 5	:	Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg harmin uygulanan grup
D- HRM 10	:	Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg harmin uygulanan grup
D-HRM 15	:	Diyabetik sıçan grubu + 15 mg/kg harmin uygulanan grup
D- HRM-NE 5	:	Diyabetik sıçan grubu + Harmin içeren nanoemülsiyon (5 mg/kg harmine eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup
D- HRM-NE 10	:	Diyabetik sıçan grubu + Harmin içeren nanoemülsiyon (10 mg/kg harmine eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup
D- HRM-NE 15	:	Diyabetik sıçan grubu + Harmin içeren nanoemülsiyon (15 mg/kg harmine eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup
DK	:	Diyabetik kontrol grubu
dL	:	Desilitre
DM	:	Diabetes Mellitus
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	:	5 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EGTA	:	Etilen glikol tetra asetik asit
FT-IR	:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi

g	: Gram
GDM	: Gestasyonel diabetes mellitus
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HbA1c	: Hemoglobin A1C
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HRM	: Harmin
HRM 15	: Sağlıklı sıçan grubu + harmin yüksek doz kontrol grubu
HRM-NE 15	: Harmin yüksek doz içeren nanoemülsiyon formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grubu
kg	: Kilogram
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Miktar Tayin Sınırı
LPO	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
NA	: Nikotinamid
NE	: Nanoemülsiyon
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
PDI	: Polidispersite indeksi
ROT	: Reaktif oksijen türleri

RNS	:	Reaktif nitrojen türleri
SK	:	Sağlıklı kontrol grup
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	:	Süperoksit dismutaz
STZ	:	Streptozotosin
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TNB	:	5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TURDEP	:	Türkiye Diyabet Epidemiyoloji
UDF	:	Uluslararası Diyabet Federasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Harminin biyosentetik şeması	23
Şekil 3.1. % BH hesaplanmasında kullanılan eşitlik	30
Şekil 3.2. Varyasyon katsayısının hesaplanmasında kullanılan eşitlik	31
Şekil 3.3. LOD hesaplanmasında kullanılan eşitlik.....	31
Şekil 3.4. LOQ hesaplanmasında kullanılan eşitlik.....	31
Şekil 3.5. SOD ölçüm şeması	38
Şekil 3.6. SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan eşitlik.....	40
Şekil 3.7. GSH ölçüm şeması	41
Şekil 3.8. GSH seviyesini belirlemek için kullanılan eşitlik	42
Şekil 3.9. MDA-TBA oluşum mekanizması	43
Şekil 3.10. MDA seviyesini hesaplamak için kullanılan eşitlik	45
Şekil 3.11. Protein miktarını hesaplamak için kullanılan eşitlik	46
Şekil 4.1. HRM'ye ait FT-IR spekturumu	48
Şekil 4.2. HRM'nin UV spekturumu.....	49
Şekil 4.3. HRM'nin HPLC yöntemiyle bulunan kalibrasyon doğrusu ve denklemi	50
Şekil 4.4. Artan derişimlerdeki (1-36 µg/mL) HRM'ye ait kromotogramlar (a) ve metanole ait kromatogram (b).....	50
Şekil 4.5. Özgüllük çalışmasına ait kromatogramlar: 36 µg/mL derişimdeki HRM standart çözeltisi (a), B-NE (b).	53
Şekil 4.6. B-NE formülasyonuna ait TEM görüntüsü	55
Şekil 4.7. HRM-NE formülasyonuna ait TEM görüntüsü.....	55
Şekil 4.8. HRM, B-NE ve HRM-NE'ye ait FT-IR spekturumları.....	56

Şekil 4.9. pH 1.2 HCl ve pH 6.8 PB salım ortamlarında HRM salım profili (n=3; Ort±SS)	57
Şekil 4.10. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde ölçülen vücut ağırlıkları	60
Şekil 4.11. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde kan glukoz düzeyleri	62
Şekil 4.12. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların AST seviyeleri.....	64
Şekil 4.13. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların ALT düzeyleri	66
Şekil 4.14. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların SOD aktiviteleri.....	68
Şekil 4.15. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların GSH düzeyleri	69
Şekil 4.16. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların MDA düzeyleri.....	70
Şekil 4.17. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanması gruplara ait karaciğer kesitlerinin histolojik görüntüleri	72

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. DM'nin tanı kriterleri.....	6
Tablo 2.2. ADA ve DSÖ'e göre GDM tanı kriterleri	11
Tablo 3.1. Deneyde kullanılan kimyasallar.....	26
Tablo 3.2. Deneyde kullanılan cihazlar.....	26
Tablo 3.3. HRM'nin HPLC ile miktar tayininde kullanılacak kromatografik koşullar .	28
Tablo 4.1. Miktar tayini yöntemi için elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri ($X \pm SS$; n=6)	52
Tablo 4.2. Miktar tayini yöntemi için elde edilen enjeksiyon tekrar edilebilirliği sonuçları ($X \pm SS$; n=6)	52
Tablo 4.3. B-NE ve HRM-NE formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=9; $Ort \pm SS$)	54
Tablo 4.4. Formülasyonlara ait pH değerleri (n=3, $Ort \pm SS$)	56
Tablo 4.5. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde vücut ağırlıkları	59
Tablo 4.6. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde kan glukoz düzeyleri	61
Tablo 4.7. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası AST ve ALT düzeyleri	63
Tablo 4.8. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların SOD aktiviteleri, GSH ve MDA seviyeleri....	67

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), vücutta insülinin yetersiz olması sonucunda oluşan, kronik hiperglisemi, protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasında bozukluk, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanan damar sertliği, damar tıkanıklığı gibi belirtilerle seyreden kronik ve ilerleyici bir hastalıktır (Kahn ve ark., 2001). Diabetes Mellitus'un ülkemizde ve dünyada görülme oranının giderek artması ve tedavi harcamalarının yüksekliği, bunların yanı sıra kesin tedavi yönteminin hala geliştirilmemiş olması da bu konuyu önemli bir araştırma alanı yapmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (UDF) 2021 yılı Diyabet Atlası'nda belirtildiği üzere, 2021'de dünya genelinde diyabet hastası olan 537 milyon insan bulunduğu ve bu sayının 2030 yılında 643 milyona, 2043'te ise 783 milyon olacağı öngörülmektedir (International Diabetes Federation, 2021).

Diyabet hastalarında serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun kayda değer bir artış gösterdiği ve oksidatif stres sonucunda diyabetin ortaya çıkışı ve seyri üzerinde rolü olduğu bilinmektedir (Pitkänen ve ark., 1992). Bu sebeple diyabet gibi yaşam tarzıyla ilişkili hastalıkları önlemenin yollarını belirleyebilmek için oksidatif stres ile ilgili çalışmalar son derece yarar sağlamaktadır. Diyabet hastalığı süresince hiperglisemik durumlarda, serbest radikal düzeylerinin yükselmesi oksidatif stresi artırabilmektedir (Yang ve ark., 2011).

Diyabet gibi yaşam tarzıyla ilişkili hastalıkları önlemenin yollarını belirleyebilmek için oksidatif stres ile ilgili çalışmalar son derece yarar sağlamaktadır. Diyabette oksidatif hasarın etkilerini engellemek amacıyla doğal antioksidanlara talep giderek artmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, diyabet hastalarında antioksidan aktiviteye sahip bitkilerin ekstrelerini deneyerek oksidatif stresi baskılamaya çalışmışlardır (Wang ve Ng, 1999).

Peganum harmala (Üzerlik bitkisi) uzun ömürlü, tüysüz ve otsu bir bitkidir. Afrika, Asya ve Amerika kıtalarının sıcak bölgelerinde yaygın olarak görülmekle beraber daha çok kuzey yarım kürede büyük bir yayılım alanına sahiptir. Türkiye’de ise özellikle Orta Anadolu bölgesinde büyük bir yayılım alanına sahiptir. Bu bölgede yetişen üzerlik bitkisi genellikle 30-70 cm arasında değişen boyutlarda olup uzun ömürlü, otsu ve sert yapılı bir gövdesi vardır. Deniz seviyesinden başlayarak 1500 metre yüksekliğe kadar olan alanlarda doğal olarak bulunur. Çok parçalı ve düzensiz olan yaprakları 3-5 cm uzunluğundadır. Bazı alanlarda yetişen üzerlik bitkisi türlerinin yapraklarında benekler olduğu görülmüştür. Tek, beyazımsı ve uzun saplı çiçekleri bulunmaktadır. Bu çiçekleri ise genellikle Mayıs ile Haziran aylarında açmaktadır. Çok tohumlu olan meyvesi genel olarak nohut büyüklüğünde ve yuvarlak bir kapsül şeklindedir. Bu kapsüller sonbahar mevsimi yaklaştıkça olgunlaşır, kahverengi-siyah renkte üçgen piramit şeklini alarak 2-5 mm uzunluğa ulaşır. Bitkinin tohumları olgunlaşan bu kapsüller içinde yer almakta olup pürüzlü ve kanatlı bir yapıya sahiptirler (Kırıcı ve ark., 2018). Üzerlik bitkisinin aktif bileşenleri olan alkaloidlerin çoğu tohum ve köklerinde bulunmaktadır (Mahmoudian ve ark., 2002). Bu alkaloidler arasında, üzerlik bitkisinin ana alkaloidleri olan harmalin ve harmine bulunmaktadır. Harmalin, harmine göre daha yüksek bir toksisiteye sahiptir (Sharaf ve ark., 1997). Yapılan çalışmalar neticesinde üzerlik bitkisinin iltahap giderici, sinirsel rahatsızlıkları azaltıcı, antitümör, antidiyabetik, antioksidan ve serbest radikalleri etkisiz hale getirebilme etkisinin olduğu belirlenmiştir (Berrougui ve ark., 2006; Hamden ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2020).

Nanoemülsiyonlar (NE), su ve yağ fazlarının yüzey etkin madde/maddeler ile bir araya getirilmesi ile hazırlanan, dispers faz damlacık büyüklüğü genellikle 100-600 nm arasında olan sistemlerdir. Sıcaklık, pH ve seyreltmeye karşı dayanıklı olan bu sistemler kinetik olarak stabildir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik maddeler için uygun sistemler

olan nanoemülsiyonlar, maddelerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmaktadır. Nanoemülsiyonlar farklı uygulama yollarına (oral, topikal, nazal, parenteral vb.) yönelik hazırlanabilmektedir (Çınar, 2017; Sharma ve ark., 2010).

Yaptığımız çalışmada, harminin absorpsiyonunu artırmak için NE formülasyonu geliştirilmiş, harminin hem saf hem de NE formülasyonları Streptozotosin-Nikotinamid (STZ-NA) ile indüklenmiş diyabetik ratlara verilmiş, böylece diyabetin neden olduğu oksidatif stresin etkilerinin hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus (DM) Tanımı

Diabetes mellitus (DM), endojen insülinin mutlak ya da göreceli eksikliği veya periferik etkisizliği sonucu ortaya çıkan kronik hiperglisemi, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluk, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanmış ateroskleroz ile seyreden kronik, progresif bir hastalıktır (Kahn ve ark., 2001).

Pankreas tarafından üretilen insülin besinlerde bulunan glukozun enerji üretimi için kan dolaşımından alarak, vücuttaki hücrelere geçişini sağlayan temel hormondur. İnsülin eksikliği veya etkin şekilde kullanılmaması sonucu bu döngü bozularak DM'nin klinik bir göstergesi olan kan şekerinin yüksek seviyelere çıkmasına neden olur. Kan şekeri seviyesinin sürekli yüksek olması ise vücutta birçok organının zarar görmesine, nöropati, kardiyovasküler hastalıklar, nefropati gibi kalıcı hasarlara neden olmaktadır (Subramoniam, 2016; Yki-Järvinen, 1992).

DM lipoprotein, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında hasarlara neden olmakla beraber hiperlipidemi, hiperinsülinemi, hipertansiyon ve aterosklerozis gibi birçok komplikasyonların oluşmasına sebep olan bir hastalıktır (Kahn ve ark., 2001).

2.1.1. Epidemiyoloji

Uluslararası Diyabet Federasyonu (UDF) tarafından 2021 yılında yayımlanan Diyabet Atlası'na göre, dünya genelinde DM hasta sayısının 537 milyon olduğu, 2030 yılında bu sayının 643 milyon, 2043 yılında ise 783 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Bu tarih aralığında dünya nüfusunun %20, diyabetli insan sayısının ise %46 oranında artacağı belirtilmektedir. DM dünyada birçok ülkede insan ölümlerine sebep olan hastalıklar sıralamasında ilk 5 içerisinde yer almaktadır (International Diabetes Federation, 2021).

Son yıllarda diyabet prevalansına etki eden faktörlerde önemli düzeyde artış olduğu konusunda dikkat çekilmektedir. Özellikle Tip II diyabet için belirtilen risk faktörleri ile birlikte, genel olarak diyabet prevalansının artış sebepleri, yaşam tarzlarındaki oluşan farklılıklar (örn. fast food tüketimi, yaşam tarzındaki hareketsizlik ve obezite), ekosistemde beklenen değişimler ve şehir nüfusunun giderek yaşlanması gibi faktörler olarak gösterilmektedir. Kırsal alanlarda diyabet prevalansı % 7.2 iken kentsel alanlarda diyabet prevalansı %10,8'lik oran ile daha yüksektir (International Diabetes Federation, 2019).

Dünya nüfusuna göre Birleşmiş Milletler (BM) 20-79 yaş arası yetişkinlerde 2021 yılı diyabet prevalansının % 10.5, erkeklerde %10.8 ve kadınlarda ise %10.2 olduğunu rapor etmiştir. 2021 yılında, 215 ülke ve bölgede 20-79 yaş arası kişiler arasında diyabetli hasta sayısının 536.6 milyon olduğu düşünülmektedir. 2045 yılı için ise 783.2 milyon insanın diyabet hastası olacağı tahmin edilmektedir (Sun ve ark., 2022).

Türkiye’de ilk kez diyabet taramaları ile ilgili veriler, 1960’lı yılların başlarında Türk Diyabet Cemiyet’nin başlattığı taramalarla belirlenmeye başlamıştır. Glukozürinin fazlalığı nedeniyle başlatılan çalışmalarda 18 yaş üstünde ortalama % 1.5-2 aralığında bir prevalans bildirilmiş olup bu oran giderek yükseliş göstermiştir. Türkiye’de nüfusa dayalı ilk diyabet taraması 1999–2000 yıllarında Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu (TURDEP) tarafından yapılmış ve diyabet prevalansı yetişkin nüfusta % 7.2 ve bozulmuş Glukoz toleransı prevalansı ise %6.7 olarak bildirilmiştir. 15 şehir ve 540 merkezde Ocak 2010-Haziran 2010 tarihleri arasında tamamlanan TURDEP-II çalışmasında ise Türk yetişkin toplumunda diyabet sıklığının % 13.7’ye ulaştığı tespit edilmiştir (Satman ve ark., 2002).

2.1.2. DM'nin Tanısı

Diyabetin bilinen klasik semptomları arasında iştahsızlık, polidipsi, poliüri, polifaji, halsizlik, hızlı ve erken yorgunluk, ağız kuruluğu yer almaktadır. Bunlarla beraber daha az görülen semptomlar ise, sebepsiz ve belirlenemeyen kilo kaybı, bulanık görme, sürekli tekrarlayan enfeksiyonlar yer almaktadır (Mellitus ve Tanı, 2020). DM tanısı glisemik belirteçlerin ölçümü vasıtasıyla ortaya konulmaktadır. Bu belirteçler hemoglobin (HbA1C), açlık plazma glukozu (APG), 75 gr oral glukoz tolerans testi (OGTT) ve rastgele plazma glukozu (PG) olmak üzere 4 ayrı değerlendirme yolu vardır. Bu belirteçlerden birinin olması DM tanısı için yeterli olmaktadır (Committee, 2022; Gospin ve ark., 2017).

Tablo 2.1. DM'nin tanı kriterleri

DM'nin Tanı Kriterleri
1. Diyabet semptomları ve ≥ 200 mg/dL plazma glukoz düzeyi
2. Açlık plazma glukoz düzeyi ≥ 126 mg/dL, en az 8 saatlik tam açlık sonrası
3. Oral glukoz tolerans testinde 2. Saat plazma glukoz düzeyi > 200 mg/ dL
4. Standardize metotla (HPLC) ölçülen HbA1C $\geq \% 6.5$

Ayrıca PG düzeyine göre diyabet tanısı konulmamış ama PG değeri normalin üzerinde olan kişiler prediyabetli olarak kabul edilmiştir. Bozulmuş açlık glukozu (BAG) ve bozulmuş glukoz toleransı (BGT) olan kişiler prediyabetiktir. Bu dönemde patolojik değişiklikler meydana gelebildiği ancak klinik semptomların ise görülmediği sessiz evre olarak ifade edilmektedir. Müdahale edilmediği takdirde prediyabet ilerleyerek belli bir süre sonra Tip II diyabete dönüşmektedir (Genuth ve ark., 2003; Gospin ve ark., 2017).

1) Açlık Plazma Glukozu (APG): En az 8 saatlik açlık sonrası plazma glukoz düzeyinin ölçülmesine dayalı bir yöntemdir. APG seviyesi yetişkinlerde 74-106 mg/dL

(4.5 - 5.9 mmol/L), çocuklarda ise 60-100 mg/dL (3.5 - 5.6 mmol/L) olduğu bildirilmektedir (Organization, 2006).

2) Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT): Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), yüksek diyabet risk grubunda olan kişilere OGTT yapılmasını tavsiye etmektedir. Bu testin uygulanacağı günden, üç gün öncesinden başlanarak kişilere günlük en az 150 g karbonhidrat içirilerek diyet uygulanır. Test esnasında kişi oturur pozisyonda olmalı, fiziksel hareketlerden olabildiğince kaçınılmalı ve yiyecek ya da içecek tüketmemelidir. Yetişkinlere 75 g glukoz, çocuklara ise 75 g'ı geçmeyecek şekilde 1.75 g/kg glukoz içirilmesinden 2 saat sonra kandaki glukoz düzeyinin 140 mg/dL ve üzerinde olması durumunda tanı konulmaktadır (Organization, 2006).

3) Rastgele Kan Glukoz Ölçümü: Diyabet semptomlarının görüldüğü herhangi bir zaman diliminde yapılan ölçüm sonucu plazma glukoz seviyesinin 200 mg/dL ve üstünde olması durumunda tanı konulmaktadır (Organization, 2006).

4) Hemoglobin A1c (HbA1c): HbA1c'nin $\geq$ %6.5 olması durumunda diyabet tanısı konulmaktadır (Organization, 2006).

5) Prediyabet: Bozulmuş açlık glukozu (100-125 mg/dL) ve bozulmuş glukoz toleransını (140-199 mg/dL) ifade etmektedir (X. Zhang ve ark., 2010). Ayrıca ADA tarafından glikolize HbA1c değerinin %5.7- 6.4 aralığında olması prediyabet olarak kabul edilmektedir (Association, 2013).

2.1.3. Diyabetin Komplikasyonları

Diyabetin komplikasyonları akut ve kronik komplikasyonlar olmak üzere iki grupta incelenebilir.

A) Akut (metabolik) Komplikasyonlar: Akut komplikasyonlar dört farklı klinik olayı içermekte olup bunları şu şekilde sınıflandırabiliriz.

- Diyabetik ketoasidoz

- Hiperosmolor non-ketotik koma
- Laktik asidoz
- Hipoglisemi

B) Kronik (dejeneratif) Komplikasyonlar: Kronik komplikasyonları makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olmak üzere iki ana grupta incelemek mümkün olup bu grupları da kendi alt gruplarına aşağıdaki gibi ayrılmaktadır.

1) Makrovasküler Komplikasyonlar

- Kardiyovasküler hastalıklar
- Serebrovasküler hastalıklar
- Periferik damar hastalıkları

2) Mikrovasküler Komplikasyonlar

- Diyabetik nefropati
- Diyabetik retinopati
- Diyabetik nöropati

3) Diğer Komplikasyonlar: Beyin ile ilgili psikolojik sorunlar (demans, Alzheimer), diyabetik ayak, vs. (DG, 2007).

2.1.4. Diyabet Sınıflaması

Diyabetin nedeninin ve patogenezinin her geçen gün daha iyi anlaşılmasıyla, diyabetin sınıflaması da devamlı yenilenmektedir. Diyabetin sınıflamasına ait ilk karar, 1979 yılında Ulusal Diyabet Çalışma Grubu tarafından yayınlanmış ve 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından küçük değişikliklerle kabul edilmiştir (Canzian ve ark., 1996).

1. Tip I Diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β -hücre yıkımı vardır)
2. Tip II Diyabet (İlerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir)

3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (Gebelik ile ortaya çıkan ve çoğunlukla doğumla birlikte düzelen diyabet)

4. Diğer spesifik diyabet tipleri

2.1.4.1. Tip I Diabetes Mellitus

Tip I pankreas beta hücrelerinin T-hücre aracılı veya otoimmün dışı nedenlerle hasar görmesiyle oluşan, mutlak insülin yetmezliği ve buna bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile belirgin kronik ve metabolik bir hastalıktır. Otoimmünitenin varlığına göre de kendi içinde Tip Ia ve Tip Ib olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Devendra ve ark., 2004).

Tip I diyabet insüline bağımlı diyabet ya da genç tipi diyabet (juvenile onset) olarak adlandırılmaktadır. Bu tip diyabette pankreas beta hücrelerinden salınan insülin seviyesi ya çok düşük bir düzeye iner ya da salgılama tamamen durur. Bunun sebebi ise Pankreasın Langerhans adacık hücrelerinin lenfosit infiltrasyonu ve Beta hücrelerinin seçici tahribatıdır. Hastalık belirtisi ortaya çıktığında beta hücrelerinin neredeyse %85-90'ı parçalanmış durumdadır. Tip I diyabet hastası olanlar ketoasidoz riski altındadırlar. Hastalık tanısı konduğu dönemlerde hastalarda belirli bir kilo kaybı, çok fazla susama ve sürekli idrara çıkma yakınmaları gözlenmektedir. Bu hastalarda ketoasidoz ve ölümü engelleyebilmek için yapılabilecek tek yol günlük olarak insülin verilmesidir (Avcı, 2001).

Tip I DM insidansı; coğrafi bölge, ırk, yaş ve mevsimlerle değişkenlik göstermektedir. Tip I DM bütün yaş aralıklarında görülebileceği gibi daha çok çocukluk ve genç erişkinlik döneminin hastalığı olarak tanınmaktadır. En fazla çocuklarda 5-6 ve 10-12 yaşlarda görülmektedir. Tip I DM siyah ırkta daha az görülme olasılığı varken beyaz ırkta, özellikle Kuzey Avrupa ülkelerinde daha fazla görülmektedir (Eser, 1995).

2.1.4.2. Tip II Diabetes Mellitus

Tip II diyabet, dünyadaki bütün diyabetli hastaların % 90'ından fazlasını oluşturan, en fazla görülen diyabet türüdür. Tip II diyabette hiperglisemi, ilk olarak vücut hücrelerinin insüline tam olarak yanıt verememesinin sonucu olarak gelişir ve bu duruma insülin direnci denir. İnsülin direnci sonucunda hormon daha az etkilidir ve zamanla insülin üretiminde artışa neden olur. Zamanla pankreasın, beta hücrelerinin talebini temin edememesi sonucu yetersiz insülin üretimi gelişir (International Diabetes Federation. 2021).

Özellikle 30'lu yaşlardan sonra ortaya çıkmakta olup güçlü genetik yatkınlıktan bahsedilebilir. Başlangıçta sıklıkla semptom görülmemekte ve hastaların çoğu obez ya da fazla kiloludur (İ. Satman ve al., 2019). Tip II DM sinsi olarak başlamakta ve yıllarca asemptomatik olarak kalabilmektedir. Bu nedenle tanı konulmadan 8-12 yıl önce hastalığın başladığı söylenebilir (Klein ve ark., 1996).

Kontrol edilmeyen ve yüksek seviyede ilerleyen kan glukozu belli bir zaman sonra birçok komplikasyonun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Lipit, protein ve karbonhidrat metabolizmasında oluşan bozukluklar ile seyreden kompleks metabolik bir hastalık olan Tip II DM, sıkça obezite ile birlikte gelişip, kalp-damar hastalıkları, böbrek yetmezliği ile sonuçlanan nefropati, sinir sistemi hastalığı nöropati, körlüğe kadar götüren retinopati ve ayak ülserleri gibi uzun vade komplikasyonları sonucu felç, gangren veya koroner hastalıkların oluşma riskini artırmaktadır (Özkan, 1998; Wareham ve O'Rahilly, 1998).

Diyabet tedavisinde temel amaç; plazma glukozunun normal sınırlarda olması, oluşacak komplikasyonların önüne geçilmesi ve kardiyovasküler risk faktörlerinin kontrol altına alınması olmalıdır. Düzenli kontroller ile etkili yaşam tarzı yönetimi ve

gerekirse ilaç tedavisi ile erken oluşabilecek diyabetin önüne geçilebilir ve Tip II diyabetli kişiler daha uzun ve sağlıklı bir yaşam sürdürebilmektedir. (Satman ve ark., 2019).

2.1.4.3. Gestasyonel Diyabet (GDM)

Gebelikle beraber oluşan ve genelde gebeliğin 24-28. haftalarında yapılan testler ile tanımlanabilen ve çoğu kez gebelikten sonra son bulan bir diyabet tipidir (Plows ve ark., 2018). UDF 2017 tahminlerine göre, GDM dünya çapındaki hamileliklerin %14'ünü etkilemekte ve bu oranın yılda yaklaşık 18 milyon doğuma denk geldiği bilinmektedir. GDM, insülin direnci sebebiyle ortaya çıkar ve bunun nedeni ise plasentanın hormon üretimidir. Gestasyonel diyabetin oluşmasında en önemli etkiler ise; ileri yaş, gebelik süresince alınan fazla kilolar, obezite, ailede diyabet varlığı veya doğumsal anomaliye sahip bebek doğurmak sayılabilir. GDM, gebelik süresince daha çok ikinci ve üçüncü trimesterlerde gözlemlenirken aynı zamanda gebeliğin herhangi bir döneminde de ortaya çıkabilmektedir (Federation, 2017).

ADA ve DSÖ'ye göre GDM tanı kriterleri aşağıdaki tabloda özet halinde gösterilmiştir (International Diabetes Federation. 2021).

Tablo 2.2. ADA ve DSÖ'e göre GDM tanı kriterleri

		APG(mg/dL)	1.saat PG(mg/dL)	2.saat PG(mg/dL)	3.saat PG(mg/dL)
DSÖ kriterleri 1999	75 g glukozlu OGTT (Bir patolojik sonuç tanı için yeterlidir).	≥126	-	≥140	-
ADA kriterleri	75 g glukozlu OGTT (Bir patolojik sonuç tanı için yeterlidir).	≥92	≥180	≥153	-

2.1.4.4. Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet

Diyabetli kişi Tip I, Tip II DM ya da GDM değilse spesifik nedenlere bağlı diyabet olarak tanımlanabilir. Beta hücre fonksiyonunda oluşan genetik defektler, insülin etkisinde genetik defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaçlarla ve kimyasal maddelerle oluşan diyabet ve diyabet ile birlikte görülen diğer genetik sendromların sebep olduğu diyabet, spesifik nedenlere bağlı diyabet türleri olarak adlandırılmaktadır (Grubu, 2020).

2.2. Oksidatif Stres

Enerjinin açığa çıktığı birçok metabolik reaksiyon sırasında oksijen kullanılır ve bu reaksiyonlar esnasında moleküler oksijen indirgenir ve su oluşur. Oksijen tam indirgenmediği zaman ise bağışıklık ve hücre canlılığı için tehlike meydana getirebilecek yeni moleküller sentez edilir. Bunun sonucunda oksijenin serbest radikalleri ve reaktif oksijen ürünlerine fazla maruziyet, hücre ve dokularda toksik etki göstererek hücreler için tehlikeli bir durum ortaya çıkarabilmektedir (Sies, 2020). Oksidatif stres, reaktif oksijen barındıran bileşiklerin normal şartlar altında olması gerekenden çok daha fazla olduğu biyolojik sistemdeki oksidan türler lehine dengenin bozulduğu hücre veya hücre gruplarının spesifik bir durumu olarak tanımlanabilir (Pisoschi ve Pop, 2015).

Aerobik şartlarda hücreler güçlü antioksidan sistemler tarafından korunurken oluşan reaktif moleküller ve antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge mevcuttur (Sies, 2020). Bu denge bozulduğunda hücresel fonksiyonlar kaybolarak patolojik olgular ortaya çıkar. Başka bir deyişle reaktif oksijen çeşitlerinin üretimi antioksidan savunma sistemlerinin aktivitesinden daha fazla olması durumuna oksidatif stres denilmektedir (Finaud ve ark., 2006).

Organizmalar tarafından çeşitli özelliklere sahip farklı serbest radikaller üretilmektedir. Üretilen bu türler arasında reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve oksitlenmiş lipidler olabilir (Finaud ve ark., 2006; Zeb, 2015).

Oksidatif stresin ortaya çıkarılmasında çeşitli belirteçler kullanılmaktadır. Belirteçlerdeki artış oksidatif stres durumunun varlığını göstermektedir. Bu belirteçlerden malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonu (LPO)'nu belirtmesi nedeniyle önemli bir yere sahiptir ve yıllardır en fazla analizi yapılan belirteçler arasında yer almaktadır (Czerska ve ark., 2015).

ROS lipid, protein ve nükleik asit gibi hücrede bulunan temel bileşenlere farklı hasarlar meydana getirebilmektedir. Bu hasarların biyolojik yaşlanmada etkili rol aldığı ve birçok hastalığa sebep olduğu yapılan araştırmalar ile kanıtlanmıştır (Kopáni ve ark., 2006). Bütün bunlarla beraber diyabet, karaciğerin enflamatuvarı, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik hastalıklar gibi birçok hastalığın ortaya çıkma ve ilerleme sebebi oksidatif stres olarak düşünülmektedir (Bhatti ve ark., 2017).

2.2.1. Oksidatif Stres ve Diyabet İlişkisi

Diyabet hastalarında serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun önemli düzeyde artması sebebiyle diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde oksidatif stresin etkisi oldukça önemlidir (Pitkänen ve ark., 1992). Serbest radikallerin diyabet süresince yüksek seviyede olması oksidatif stresin artmasına neden olabilmektedir (Yang ve ark., 2011).

Diyabette ile birlikte lipid peroksidasyonunun arttığı bilinmektedir. Bu durumun sebebi diyabetik koşullardan dolayı artan serbest radikal düzeyine bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Lipid peroksidasyonunun yan ürünlerinden biri olan MDA diyabette oksidan/ antioksidan dengesinin belirlenmesinde önemli bir göstergedir. Lipid peroksidasyonunda kararsız olan peroksitler MDA gibi aldehitlere ayrılmaktadır. MDA,

lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi MDA ölçümü ile yapılabilmektedir (Chi ve ark., 2016; Halliwell ve Gutteridge, 2015). Süperoksit radikalının zararlı etkilerine karşı aerobik organizmaları koruyan antioksidan özelliğe sahip enzimlerden biri ise SOD enzimidir. SOD kolajen dokuyu süperoksitin zararlı etkilerinden koruyarak lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir (Aslan ve ark., 1995). Antioksidan savunma sistemini değerlendirmek için total glutatyon seviyeside ölçülmektedir (Aksoy, 2002).

2.2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren atomik veya moleküler yapıdaki maddelerdir. Serbest radikaller bulundurdukları eşleşmemiş elektronlar nedeniyle kimyasal olarak çok aktiftirler ve ortamda bulunan diğer biyomoleküllere saldırarak onların biyolojik yapılarını bozarlar. Bu radikalik ve reaktif ara ürünler proteinleri, nükleik asitleri ve lipitleri oksitleyerek metabolizmada olumsuz sonuçlar oluştururlar. Antioksidan sistemler ise bu radikal ve reaktif ara ürünlerden kaynaklanan olumsuz etkileri yok etmektedirler (Fantel, 1996; Stadtman, 2004; Temple, 2000).

Serbest radikaller 3 yolla oluşabilirler (Bast ve ark., 1991; Cheeseman ve Slater, 1993; Mitchell, 1961):

1. Kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalması sonucunda oluşan homolitik kırılma,
2. Normal bir molekülde tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik kırılması,
3. Normal bir moleküle bir elektron eklenmesi.

Bu mekanizmalardan herhangi biri ile oluşan serbest radikallerin, organizmada birçok yapıda hasara neden olduğu ve hücrel fonksiyon bozukluklarına sebebiyet verdiği bilinmektedir (Kilinc ve Kilinc, 2002).

2.2.2.1. Serbest Radikal Türleri

Aerobik metabolizmaya sahip olan memelilerde moleküler oksijenden türeyen serbest radikaller serbest radikallerin kaynağını oluşturduğu kabul edilmektedir. Aerobik canlılarda enerji için moleküler oksijeni kullanmak zorunda olmaları nedeniyle oksijenin toksik ürünleri ile yaşamlarını sürdürebilme zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır (Akkus, 1995; Aruoma, 1998; Aslan ve ark., 1995).

Moleküler oksijen eşlenmemiş elektron, atomik oksijen ise eşlenmemiş iki elektrona sahiptir. Bu nedenle bazen oksijen diradikal olarak da değerlendirilmektedir. Bu yapısından dolayı oksijen diğer serbest radikallerle çok kolay reaksiyona girerken radikal olmayan maddeler ile çok daha yavaş reaksiyona girmektedir (Akkus, 1995; Aslan ve ark., 1995; Henle ve Linn, 1997).

Metabolik reaksiyonlarda oksijen suya indirgenmektedir. Bu indirgenme esnasında redüksiyon veya redüksiyon ara basamaklarında çok sayıda metabolit olarak ara ürünler oluşur. Oluşan bu ürünlerin tamamı radikal olmadığından reaktif oksijen türleri ismini almaktadırlar.(Akkus, 1995; Aslan ve ark., 1995; Bast ve ark., 1991; Halliwell, 1984).

Serbest radikallerin en önemlileri oksijen türevi serbest radikaller olup bazende oksijen türevi olmayan ve daha az olarak kükürt ve karbon merkezli radikaller de oluşmaktadır (Carr ve Frei, 1999; Girotti, 1998; Halliwell, 1994).

2.2.2.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikal kaynakları endojen ve ekzojen kaynaklar olarak ayrılmaktadır (Cemeli ve ark., 2009).

Endojen Kaynaklar

Aminoasit oksidaz, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, gibi bazı enzimlerin katalitik döngüleri sırasında serbest radikaller oluşabilmektedir (McCord ve Fridovich, 1968). Plazma membranında bulunan protein kinaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz enzimleri gibi bazı enzimlerin aktivasyonu sonucunda serbest kalan araşidonik asidin oksidasyonu ile serbest radikaller oluşmaktadır (Kadiiska ve ark., 2005).

Aktif olan fagosit hücrelerde solunumsal patlama esnasında süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi birçok reaktif oksijen türleri oluşmaktadır (Gutteridge, 1995). Hücrelerde en büyük reaktif oksijen türü kaynağı mitokondriyal elektron transport sistemidir ve bu sistemde oluşan elektron kaçağı, süperoksit radikali üretebilmektedir (Halliwell, 1994).

Ekzojen Kaynaklar

Radyasyon, solventler, hava kirliliği, stres, sigara dumanı, pestisidler gibi sebepler ise serbest radikal oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklar olarak söylenebilir (Halliwell, 1994).

2.2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller (Süperoksit radikalleri, hidroksil radikali vs.) oksidatif fosforilasyon neticesinde oluşurlar ve oksidatif hasarlara sebep olmaktadır. Çevresel etmenler vb. durumlar sonucunda serbest radikaller ile antioksidan savunma sisteminin aktivitesi arasındaki denge bozularak lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu, DNA mutasyonlarını kapsayan oksidatif hasarlar oluşmaktadır (Scandalios, 2005).

2.3. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksidatif stresin oluşmasını ve bundan kaynaklı hasarları engellemek için vücut çeşitli koruma mekanizmaları oluşturmuştur. Bu mekanizmalara antioksidan savunma mekanizmaları olarak adlandırılmaktadır. Savunma mekanizmaları hücrede oluşan hasarı

etkisiz hale getirmektedirler. Antioksidan savunma mekanizmaları, lipid peroksidasyonunun başlamasını engellemek için hidroksil radikallerini süpürmek, oksijen fazlalığını düşürmek, metal iyonlarını bağlayarak etkisiz hale getirmek gibi birçok şekilde savunma görevini yerine getirmektedirler (Gürsoy, 2008).

2.3.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanların etkisi çeşitli mekanizmalar üzerinden gerçekleşmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek.
- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalizleyen metal iyonlarını bağlayarak.
- Serbest radikalleri doğrudan ya da antioksidan enzimler aracılığıyla temizleyerek.
- Hasar gören hücresel yapıları onararak veya temizleyerek.

2.3.2. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar kaynaklarına, yapılarına, yerleşim yerlerine ve çözünürlüklerine göre sınıflandırılabilirler (Evcimen, 2015).

- Yapılarına göre: Enzim olan, enzim olmayan
- Çözünürlüklerine göre: Yağda çözünenler, suda çözünenler
- Yerleşimlerine göre: Hücre içinde bulunanlar, plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar
- Kaynaklarına göre: Endojen antioksidanlar, Eksojen antioksidanlar

2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Oksijeni metabolik olarak kullanan tüm hücrelerde bulunmaktadır. Süperoksitin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizlemektedir (Sezer ve Keskin, 2014). Oksidatif

strese karşı ilk ve öncelikli savunma mekanizmasını SOD oluşturmaktadır. Bunun nedeni ise süperoksit anyonu serbest radikaller zincir reaksiyonlarını güçlü bir şekilde tetikler (M. Aksoy, 2008). Vücutta iki çeşit SOD bulunmakta olup biri sitoplâzmada yer almakta olup içeriğinde bakır ve çinko (Cu-Zn) ihtiva eder, diğeri ise manganer (Mn) içerir ve mitokondride bulunur. Metabolizmanın normal düzeylerde olduğı durumunlarda hücrelerde süperoksit yüksek oranda bulunsada SOD enzim aktivitesi ile süperoksit seviyeleri hücre içinde düşük tutulur. SOD enziminin hücre içi aktivitesi yüksek, hücre dışı aktivitesi ise düşüktür (Çıkrıkçioğlu, 2001).

Katalaz

Katalaz bir hemoprotein olup 4 adet hem grubu bulunduran tüm canlı hücre çeşitlerinde farklı miktarlarda bulunmaktadır. Oksijene maruz kalan hemen hemen bütün organizmalarda peroksizomlarda bulunmaktadır (Kirkman ve Gaetani, 1984). Daha az oranlarda ise hücrenin mikrozomal ve sitozol kısımlarında yer almaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Katalaz (CAT), hidrojen peroksit ile etkin bir şekilde reaksiyona girerek hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalize etmektedir. Milyonlarca molekül hidrojen peroksiti bir molekül CAT parçalayabilmektedir (Kirkman ve Gaetani, 1984).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz

Vücut tarafından oksidatif hasara karşı kullanılan temel savunma mekanizmalarından biri glutatyondur. Hücrelerde oluşan hidrojenperoksidin indirgenmesinden sorumlu olan glutasyon peroksidaz tetramerik 4 selenyum atomu içermekte olup sitozolik bir enzimdir (Tsai, 1975). Eritrositlerde oksidatif strese karşı en güçlü ve hayati antioksidan ajandır. Serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önlemektedir (Akkus, 1995).

Hücrelerde hidrojenperoksidin uzaklaştırılması GPx ve katalaz enzimi vasıtasıyla gerçekleştirilir. GPx düşük hidrojenperoksit konsantrasyonlarında etkili olmakta iken, katalaz daha yüksek konsantrasyonlarda etki göstermektedir. Bu etki sayesinde GPx hücrede meydana gelen hidrojenperoksit ve lipid peroksidlerini ortamdan uzaklaştırmada çok daha etkilidir. Bu sayede lipid peroksidasyonunu engelleyerek, biyolojik membranların yapısının bozulmamasında ve fonksiyonlarını sürdürmelerinde önemli bir görev üstlenmektedirler (Freeman ve Crapo, 1982).

Glutasyon redüktaz ise glutasyon peroksidazın hidroperoksitleri indirgemesi ile oluşan yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüştürerek dolaylı olarak antioksidan etki göstermektedir (Smith, 2005).

2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar aktivitesi hücre dışı sıvılarda çok sınırlı ve düşük orandadır. Bu sebeple enzimatik olmayan antioksidanlar hücre dışı ortamlarda daha aktif rol alırlar (Halliwell, 1991). Vitaminler genel olarak biyokimyasal olayların düzenlenmesinde rol üstlenirken, A, C ve E vitaminleri serbest radikallerin hücrede oluşturacağı oksidatif hasarları önleyerek hücrelerin normal bir şekilde işlevlerini sürdürebilmeleri için etki gösterirler. Hücre çeperinde β -karoten görev almakta iken, E vitamini selenyum yardımıyla hücre dışından içeri girmeye çalışmakta olan saldırganlara karşı savunma hattını korumaktadır. Hücrelerde bulunan E vitamini lipidleri oksidatif hasara karşı korumaktayken C vitamini ise serbest radikallerin oluşturduğu etkileri süpürücü özellik göstermektedir (Valko ve ark., 2006).

2.4. Botanik Bilgiler

2.4.1. *Peganum harmala* L. (Üzerlik Otu)

Peganum harmala (Üzerlik bitkisi) tüysüz, otsu, çok yıllık bir bitki olup yaklaşık 30-70 cm boyunda gövdesi sert bitki olarak bilinmektedir. Daha çok kuzey yarım kürede

büyük bir yayılım alanına sahiptir. Afrika, Asya ve Amerika kıtalarının sıcak bölgelerinde görülmektedir. Ülkemizde ise genellikle Orta Anadolu bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır (Kırıcı ve ark., 2018).

Üzerlik bitkisi yaprakları 3-5 cm uzunluğunda olup düzensiz ve çok parçalı, çiçekleri ise uzun saplı olup tek ve beyazımsı renklidir. Bitkinin farklı bölgelerde yetişen türlerinin bazılarının yapraklarında benek olduğu gözlemlenmiştir. Üzerlik bitkisi genellikle Mayıs ve Haziran aylarında çiçek açmaktadır. Nohut büyüklüğünde toparlak bir kapsül biçiminde çok tohumlu bir meyveye sahiptir. Bu kapsüller üçgen piramit şeklinde olup kahverengi- siyah renktedirler ve sonbahar mevsimine doğru olgunlaşarak 2-5 mm uzunluğa ulaşmaktadırlar. Olgunlaşan kapsüller üzerinde pürtüklü ve kanatlı tohumlar yer almaktadırlar (Kırıcı ve ark., 2018).

Üzerlik bitkisinin aktif bileşenleri olan alkaloidler tohumlarda ve bitkinin köklerinde bulunduğundan daha çok tohumları kullanılmaktadır (Mahmoudian ve ark., 2002). Farklı kültürlerde ve dinlerde çok eski yıllardan beri tıbbi, dini ve ritüel amaçlarla kullanılmıştır. Örneğin; Eski Mısırlılar üzerlik bitkisini nazardan korunmada kullanmışlardır. Günümüzde ise bu gelenek Kuzey Afrika'da halen daha devam etmektedir (Berkli, 2007).

Geçmiş yıllarda birçok medeniyetler tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan üzerlik bitkisi günümüzde modern tıpta da farklı alanlarda (merkezi sinir sistemi uyarıcısı, solucan düşürücü) kullanılmaktadır. Halk arasında da çeşitli hastalıkların tedavisinde farklı şekillerde kullanılmaktadır. Bitki tohumlarının kaynatılıp kullanılması sonucu kanı temizlediği, kan yaptığı, cildi güzelleştirdiği ve basur için kullanılması sonucu tedavi ettiği bildirilmektedir (Başbağ, 1993).

2.4.1.1. Farmakolojik Özellikleri

Antikanser Etki: Peganum harmala tohum ekstreleri meme kanseri hücre hattında denenmiş ve kanser hücre hattının büyüme hızını azalttığı gözlemlenmiştir (Shabani ve ark., 2015).

Antimikrobiyal: Üzerlik tohumları kullanılarak hazırlanan kloroform, petrol eteri ve metanol ekstrelerinin, agar dilüsyon yöntemi ile mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve özellikle metanol ekstresinin güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Prashanth ve John, 1999).

Antiviral Etki: Üzerlik tohumları ile hazırlanan etanol ekstresi ve etanol ekstresinin fraksiyonunun influenza virüsüne karşı etkisi incelenmiş ve bu virüsün etkilerini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Moradi ve ark., 2017).

Antidepresan Etki: Üzerlik bitkisinin tohum, kök, çiçek, yaprak ve meyve kısımlarından oluşturulan ekstratlarla gerçekleştirilen bir çalışmada, ekstratların monoamin oksidaz A ve monoamin oksidaz B inhibisyon etkisine bakılarak elde edilen sonuçlar ışığında antidepresan potansiyelleri değerlendirilmiştir. Tohum ekstresinin insanda monoamin oksidaz A'nın güçlü inhibitörü olduğu, yine tohum ve kök ekstrelerinin monoamin oksidaz B'ye karşı zayıf bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Herraiz ve ark., 2010).

2.4.2. Harmin (HRM)

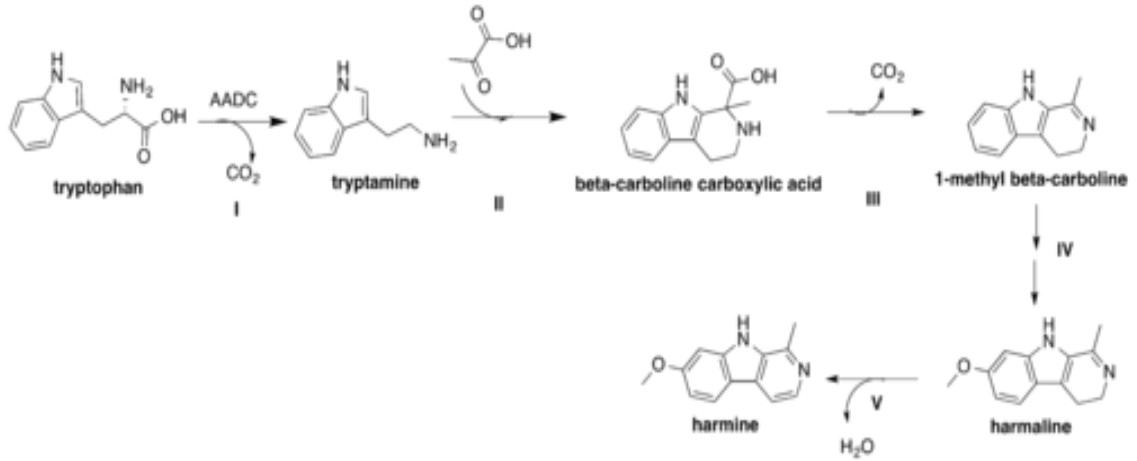
Üzerlik bitkisinin başlıca β -karbolin türevi alkaloidleri harman, harmalol, harmin, harmol ve harmalin olup bunların yanında harmasilin, harmalasinin, harmalasidin, harmalanin, norharmin ve izoharmin alkaloidleri de çalışmalarda izole edilmiştir (Chatterjee ve Ganguly, 1968; Küsmenoğlu, 1996; Sıddıqui ve ark., 1987, 1989). Bu alkaloidlerden harmalin ve harmin üzerlik bitkisinin en önemli alkaloidleri olup, harmin harmaline göre daha az toksiktir (Sharaf ve ark., 1997).

Harmin (HRM) üzerlik bitkisinin aktif bileşenlerinin en önemlilerindendir (Pour ve Moghadar, 2012). Harmin, ilk olarak 1847 yılında Peganum harmala tohumlarından izole edilmiştir. Harmin, antimikrobiyal, antitümör, antifungal, sitotoksik, antiplasmodial, antioksidan, antimutagenik, antijenotoksik ve halüsinojenik özellikler gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir (Patel ve ark., 2012).

HRM gösterdiği antioksidan aktivite ile serbest radikalleri süpürerek oksidatif stresin etkilerini azaltmaktadır. Ayrıca bu antioksidan aktivitesi sayesinde LDL oksidasyonunu inhibe etmekte ve E vitamininin kaybolma oranını azaltmaktadır (Berrougui ve ark., 2006).

HRM (7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b] indol), geniş spektrumlu anti-inflamatuar ve antitümör aktivitelerine sahip bir β -karbolin alkaloididir. Harmin son yıllarda diyabet tedavisinde büyük potansiyel göstermiştir (Wang ve ark., 2015).

Şikimat asit yolu, aromatik amino asit L-triptofanı verir. L-triptofanın aromatik L-amino asit dekarboksilaz (AADC) ile dekarboksilasyonu, bitişik halde bulunan nitrojen atomu sebebi ile indol halkasının C-2 karbonunda bir nükleofilik merkez içeren ve Mannich' e katılımı sağlayan triptamini üretmektedir. Yeniden düzenlemeler sonucunda triptaminden bir Schiff bazı oluşur ve piruvat ile reaksiyona girerek β -karbolin karboksilik asit oluşturur. β -karbolin karboksilik asit ise 1-metil β -karbolin oluşturmak için dekarboksilasyona maruz kaldıktan sonra hidroksilasyon ve ardından metilasyon sonucunda harmalin oluşur (Berlin ve ark., 1993). Son olarak oluşan harmalinin oksidasyonu ile birlikte su kaybı sonucunda harmin üretilir. Harmin için biyosentetik şema aşağıdaki Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (Nettleship ve Slaytor, 1974).



Şekil 2.1. Harminin biyosentetik şeması

2.5. Nanoemülsiyonlar (NE)

2.5.1. NE Kavramı ve Özellikleri

Nanoemülsiyonlar su ve yağ fazlarının yüzey aktif madde(ler) yardımıyla biraraya getirilmesi ile hazırlanan, kinetik olarak stabil taşıyıcı sistemlerdir (Basha ve ark., 2013). Genel olarak damlacık boyutları 100-500 nm arasında değişen ve damlacık boyutuna göre saydam veya yarı-saydam görünümde olan kolloidal dağılımlardır (Shah ve ark., 2010). Nanoemülsiyonlar, damlacıkların yağ veya su olmasına göre Y/S veya S/Y tipinde hazırlanabilmektedir. Nano-boyutlu damlacıklarda Brown hareketleri baskındır. Bu nedenle nanoemülsiyonlarda kremalaşma ve flokülasyon gibi stabilite problemleri uzun süre boyunca görülmez. Sıcaklık ve pH değişimi, seyreltme gibi dış etkilere karşı dayanıklı sistemlerdir. Termodinamik açıdan kararlı olmayan nanoemülsiyonların hazırlanabilmesi için sisteme dışardan enerji verilmesi gerekmektedir (Solans ve ark., 2005).

NE'lerin hazırlanmasında yağ fazı, su fazı ve yüzey aktif maddeler (sürfaktanlar) kullanılmaktadır (İlyasoğlu ve El, 2010).

- **Yağ fazı:** Mumlar, katı ve sıvı yağlar, yağ alkol ve asitleri ile bunların esterleri, hidrokarbonları, gliseritleri ve silikonları içeren türevler, yağ fazı olarak kullanılmaktadır (Weiss ve ark., 2006).
- **Su fazı:** Su ve su ile karışabilen hidrofilik özelliğe sahip maddelerden oluşmaktadır (Weiss ve ark., 2006).
- **Sürfaktan:** Emülsiyonlarda iki sıvının temas halinde olduğu her yerde ara yüzey gerilimi oluşmaktadır. Oluşan bu gerilim ise surfaktanlar kullanılarak büyük ölçüde azaltılabilmektedir (Mason ve ark., 2006).

2.5.2. Nanoemülsiyonların Üstünlükleri

- Kinetik olarak stabil sistemlerdir.
- Çok küçük damlacık boyutları nedeniyle Brown hareketleri yerçekimine göre daha baskındır. Bu sayede saklama sırasında sedimentasyon ve kremalaşma olayları görülmez. Ayrıca damlacıklar arasındaki yüzey aktif maddelerin oluşturduğu dayanıklı film, flokülasyonu ve koalesensi önleyerek faz ayrımının önüne geçer.
- NE'ler etkin maddelerin/aktif bileşiklerin daha çok absorbe edilmesini sağlamaktadırlar.
- NE'ler kokuların maskelenmesinde kullanılabilirler.
- NE'ler, çözünürlük sorunu olan aktif bileşiklerin çözünürlüklerini artırır. Hidrofobik veya hidrofilik özellikteki aktif bileşiklerin bu sistemde çözünebilmesi sayesinde bu maddelerin emilim ve biyoyararlanımlarında artış sağlanır.
- NE'ler kişisel bakım ürünlerinde ve parfümlerde taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir. Bu sayede alkol kullanılmadan parfümler üretilmektedir.
- NE'ler aktif bileşiklerin çevre şartlarından olumsuz yönde etkilenmesini önleyerek stabilitelerinin artırılmasını sağlar (Abolmaali ve ark., 2011; Lovelyn ve Attama, 2011; Sarker ve ark., 2015; Setya ve ark., 2014, Xin ve ark., 2013).

2.5.3. Nanoemülsiyonların Sakıncaları

- Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutu küçültüldüğü için maliyet artmaktadır. Bunun nedeni ise formülasyon hazırlanmasında birçok özel cihaz ve alet kullanılmasıdır.
- Erime noktası yüksek olan maddelerde çözünme sorunu ortaya çıkabilmektedir.
- Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutu küçülmesi nedeniyle Ostwald olgunlaşmasının yaşanma riski söz konusudur. Bu sebeple nanoemülsiyonlar kullanılmadan kısa süre önce üretilmesi tavsiye edilir (Chime ve ark., 2014).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Menşei
Harmin	Termo Scientific, Hindistan
Streptozotosin	Sigma Aldrich, ABD
Metanol (HPLC grade)	Isolab, Almanya
Ripa Buffer	Sigma Aldrich, ABD
EDTA	Sigma Aldrich, ABD
HEPES	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum fosfat monobazik	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum fosfat dibazik	Sigma Aldrich, ABD
Trizma-HCl	Sigma Aldrich, ABD
Ketamin hidroklorür	Eczacıbaşı, Turkey
Ksilazin	Bioveta, Turkey
Nikotinamid	Sigma Aldrich, ABD
Oleik asit	Fisher Chemical, UK
Labrasol	Gatte Fosse, Fransa
Tween 80	Merck, Almanya
Span 80	Sigma, USA
Pluronic F68	BASF, Almanya
Etanol (HPLC grade)	Sigma Aldrich, ABD

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Deneyde kullanılan cihazlar

Cihazlar	Firma
Hassas Terazı	AND, Japonya
Hassas Terazı	Shimadzu, Japonya
Buzdolabı (-86 °C)	Nuaire NU-9483E, USA

Tablo 3.2. (Devamı)

Cihazlar	Firma
Derin dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Zetasizer	Malvern Zetasizer Nano ZSP, İngiltere
Manyetik karıştırıcı	Wisd Lab Instruments, Almanya
Ultra-Turrax	T10, Ultra-Turrax, IKA, Almanya
Ultra saf su cihazı	Millipore, Direct-Q 3UV, ABD
HPLC cihazı	Thermo Finnigan Surveyor, ABD
Sonikatör	Bandelin Sonopuls
Doku homojenizatörü	TissueLyser II
Santrifüj	Hettich UNIVERSAL 32 R
pH metre	Thermo Scientific, Orion 3 Star™, ABD
TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu)	Hitachi HighTech HT7700, Japonya
Yatay Çalkalayıcı su banyosu	Memmert, Almanya
Fourier Dönüştümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrometresi	Shimadzu IRSprit-T cihazı, Japonya
Spektrofotometre	Thermo Scientific, MULTISKAN GO, ABD
Otomatik pipetler	Eppendorf Research Plus
Vortex	IKA®-Werke GmbH&Co., Almanya
Ultrasonik prob	Sonoplus, HD 2070; Bandelin Electronics, Almanya

3.2. Metot

NE formülasyonlarının hazırlanması ve *in vitro* karakterizasyon çalışmaları Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Meltem ÇETİN ve Dr. Öğr. Üyesi Afife Büşra UĞUR KAPLAN tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. HRM'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

HRM'nin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için UV ve FT-IR spektrumları alınmıştır.

3.2.1.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrumu

HRM'nin FT-IR spekturumu 4000-400 cm⁻¹ aralığında alınmıştır.

3.2.1.2. UV Spektrumu

HRM'nin metanol ile 10 µg/mL derişimde çözeltisi hazırlanmış ve UV spekturumu 200-400 nm dalga boyu arasında alınmıştır.

3.2.2. HRM'nin HPLC ile Miktar Tayini

Yapılan literatür taraması ve ön çalışmalar sonucunda hareketli faz olarak metanol ve ultra saf su karışımının kullanılmasına karar verilerek farklı oranları denenmiş ve en uygun hareketli faz bileşimi seçilmiştir. HRM'nin miktar tayini için kullanılacak kromatografik koşullar Tablo 3.3'de özetlenmiştir.

Tablo 3.3. HRM'nin HPLC ile miktar tayininde kullanılacak kromatografik koşullar

Kromatografik Koşullar	
Cihaz	HPLC; Thermo Finnigan Surveyor
Yöntem	Ters Faz Kromatografi /İzokratik Elüsyon
Kolon	C18, 4.6mm×250mm, 5µm (MZ Analysentechnik, Almanya)
Hareketli Faz	Metanol: %1 formik asit içeren ultra saf su (50:50)
Akış Hızı	1 mL/dk
Dedektör	UV
Dalga Boyu	243 nm
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Sıcaklık	25°C
Analiz süresi	8 dakika

3.2.2.1. HRM'ye Ait Kalibrasyon Doğrusu

HRM'ye ait kalibrasyon doğrusunu elde etmek için HRM'nin metanol içindeki 50 µg/mL derişimindeki stok çözeltiden hareketle, uygun seyreltmeler metanol ile yapılarak, 1-36 µg/mL derişim aralığında altı farklı derişimde ve her bir derişim için 6'şar adet

olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltiler belirlenen koşullarda HPLC ile analiz edilerek her bir derişim ve bu derişime karşılık gelen pik alanları grafiğe geçirilerek regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi elde edilmiştir.

3.2.2.2. Analitik Yöntem Geçerliliği

Analitik yöntem validasyonu, miktar tayini için geliştirilen yöntemin doğru, özgül ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermek için gerçekleştirilir. Çalışmamızda analitik yöntem validasyonu ICH (Q2) R1 kılavuzuna göre gerçekleştirilmiş ve doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgüllük, saptanabilirlik ve tayin edilebilirlik sınırı (LOD ve LOQ) ile stabilite kriterleri incelenmiştir (Agency, 1995).

Doğrusallık

Analitik yöntemde doğrusallık parametresi, miktar tayini yapılacak olan maddenin konsantrasyonu ile analiz sonuçlarının belirli bir aralıkta doğru orantılı olmasıdır. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen pik alanları kullanılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve elde edilen doğrunun regresyon analizi yapılarak doğru denklemi ve tanımlayıcılık katsayısının hesaplanması ile doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir.

HRM'ye ait kalibrasyon doğrusunu elde etmek için HRM'nin metanol içindeki 50 µg/mL derişimindeki stok çözeltiden hareketle, uygun seyreltmeler metanol ile yapılarak, 1-36 µg/mL derişim aralığında altı farklı derişimde ve her bir derişim için 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltiler belirlenen koşullarda HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, her bir derişim ve derişimlere karşılık gelen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları elde edilmiştir. Elde edilen doğrunun regresyon analizi yapılarak doğru denklemi ve tanımlayıcılık katsayısı (R^2) belirlenmiştir (Shabir, 2003a).

Doğruluk

Doğruluk parametresi, analiz sonucu elde edilen değerlerin gerçek değerlere olan yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluk parametresi gün içi ve günler arası olarak çalışılmıştır. HRM'nin 50 µg/mL derişimindeki stok çözeltisinden hareketle, uygun seyreltmeler metanol ile yapılarak, düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere 3 farklı derişimde (2, 16 ve 32 µg/mL) ve her bir derişimden 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Gün içi doğruluğun belirlenmesi için hazırlanan standart çözeltiler aynı gün içinde arka arkaya analiz edilmiştir. Günler arası doğruluğun belirlenmesinde ise aynı işlemler arka arkaya 3 gün boyunca yapılmıştır. Doğruluk parametresinin değerlendirilmesi için analiz sonucu elde edilen derişimler kullanılarak % bağıl hata (%BH) değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin geçerliliğinde doğruluk parametresinin sağlanabilmesi için % BH değerinin % ±2'den küçük olması gerekmektedir (Mowafy ve ark., 2012; Shabir, 2003).

$$\% BH = \frac{b - a}{a} \times 100$$

Şekil 3.1. % BH hesaplanmasında kullanılan eşitlik
a: Hazırlanan (Teorik) derişim b: Ortalama tayin edilen derişim

Kesinlik

Kesinlik parametresi, analiz sonucu elde edilen değerlerin birbirine yakınlık derecesini ifade etmektedir. Kesinlik parametresi gün içi ve günler arası olarak çalışılmış, ayrıca enjeksiyon tekrar edilebilirliği değerlendirilmiştir. HRM'nin 50 µg/mL derişimindeki stok çözeltisinden hareketle, uygun seyreltmeler metanol ile yapılarak, düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere 3 farklı derişimde (2, 16 ve 32 µg/mL) ve her bir derişimden 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Gün içi kesinliğin belirlenmesi için hazırlanan standart çözeltiler aynı gün içinde arka arkaya

analiz edilmiştir. Günler arası kesinliğin belirlenmesinde ise aynı işlemler arka arkaya 3 gün boyunca yapılmıştır. Kesinlik parametresinin değerlendirilmesi için analiz sonucu elde edilen derişimler kullanılarak varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

$$VK = \frac{\text{Standart Sapma (SS)}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

Şekil 3.2. Varyasyon katsayısının hesaplanmasında kullanılan eşitlik

Analitik yöntemin geçerliliğinde kesinlik parametresinin sağlanabilmesi için VK değerinin % 2’den küçük olması gerekmektedir (Mowafy ve ark., 2012; Shabir, 2003).

Saptanabilirlik Sınırı (LOD) ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (LOQ)

Saptanabilirlik sınırı (LOD), analiz şartlarında saptanabilenen en düşük analit derişimi olarak ifade edilmektedir. Elde edilen kalibrasyon denklemindeki ($y=mx+n$) “n” değerlerinin standart sapmasının “m” değerine oranının 3.3 katı olarak hesaplanmıştır. Tayin edilebilirlik sınırı (LOQ), analiz şartlarında uygun doğruluk ve kesinlikle analitin tayin edilebildiği en küçük derişim olarak ifade edilmektedir. Elde edilen kalibrasyon denklemindeki ($y=mx+n$) “n” değerlerinin standart sapmasının “m” değerine oranının 10 katı olarak hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{\text{Regresyon Doğrularının Aynı Konsantrasyon Noktasında Elde Edilen } y - \text{Kesişim Değerlerinin Standart Sapması}}{\text{Kalibrasyon Doğrusunun Eğimi}} \times 3.3$$

Şekil 3.3. LOD hesaplanmasında kullanılan eşitlik

$$LOQ = \frac{\text{Regresyon Doğrularının Aynı Konsantrasyon Noktasında Elde Edilen } y - \text{Kesişim Değerlerinin Standart Sapması}}{\text{Kalibrasyon Doğrusunun Eğimi}} \times 10$$

Şekil 3.4. LOQ hesaplanmasında kullanılan eşitlik

Özgüllük

Özgüllük parametresi, analitik yöntemin sadece analiz edilecek maddeyi tayin edebilme yeteneği olarak ifade edilmektedir. Özgüllük parametresinin değerlendirilmesinde, HRM içermeyen (boş) nanoemülsiyon formülasyonu (B-NE) hazırlanarak aynı şartlarda HPLC analizi yapılmış ve HRM piki ile etkileşime neden olup olmayacağı değerlendirilmiştir.

Stabilite

HRM'nin 50 µg/mL derişimindeki stok çözeltisinden hareketle, uygun seyreltmeler metanol ile yapılarak, düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere 3 farklı derişimde (2, 16 ve 32 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanmış ve hazırlanan bu çözeltiler 3 farklı sıcaklıkta (-20 °C, 2-8 °C ve 25 °C), ışıktan korunarak saklanmıştır. Daha sonra belirlenen günlerde (0., 1., 2., 3. ve 7. günlerde) analiz edilmiştir. Stabilite parametresi % geri kazanım değerleri hesaplanarak incelenmiştir. Etkin maddelerin belirlenen koşullar altında stabil olduğunun söylenebilmesi için hesaplanan % geri kazanım değerlerinin % 95-105 aralığı içinde olması istenmektedir (Abraham, 2010; Osel ve ark., 2021; Shabir, 2003).

3.2.3. NE Formülasyonunun Hazırlanması

HRM içermeyen (Boş; B-NE) veya HRM içeren (HRM-NE) nanoemülsiyon formülasyonları, oleik asit (%10), Span 80 (%2), Labrasol (%2), Tween 80 (%1), Pluronic F68 (%1), ve ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. İlk olarak yağ fazı (oleik asit, Span 80, Labrasol ve HRM) ve su fazı (Tween 80, Pluronic F68 ve ultra saf su) ayrı ayrı hazırlanmıştır. Manyetik karıştırma altında (750 rpm) su fazı yağ fazına ilave edilmiş ve kaba emülsiyon hazırlanmıştır. Kaba emülsiyon önce yüksek hızlı karıştırıcı (Ultraturrax; 25000 rpm, 5dk) ardından ultrasonikasyon (%50 güç, 15 dk) ile homojenize edilerek

damlacıkların nano-boyuta indirilmesi sağlanmıştır. B-NE'ler ise HRM ilavesi olmadan aynı prosedür kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.4. NE Formülasyonların Karakterizasyonu

3.2.4.1. Santrifüj Testi

NE formülasyonlarında faz ayrımı olup olmadığı öncelikle makroskobik olarak incelenmiştir. Ardından formülasyonlar santrifüj testine tabi tutulmuştur. Falkon tüplere 5'er g formülasyon (B-NE veya HRM-NE) tartılmış ve 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda faz ayrımı olup olmadığı makroskobik olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.2. Damlacık Büyüklüğü ve Dağılımının Tayini

NE formülasyonlarının damlacık büyüklükleri ve dağılımlarının (polidispersite indeksi; PDI) belirlenmesi için Zetasizer Nano ZSP (Malvern Ins. Ltd., İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Ölçümler, 9 farklı numune (100 kat seyreltilerek) ile 25°C'de yapılmış ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir. Analiz, Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan DAYTAM'da gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. Zeta Potansiyelin Belirlenmesi

Zeta potansiyel ölçümleri için damlacık boyutu ölçümlerinde de kullanılan Zetasizer Nano ZSP cihazı kullanılmıştır. Ölçümler, 9 farklı numune (100 kat seyreltilerek) ile 25°C'de yapılmış ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir. Analiz, Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan DAYTAM'da gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.4. Morfolojik Analiz

Nanoemülsiyon formülasyonlarının morfolojik analizi TEM (Hitachi HighTech HT7700, Japonya) ile yapılmıştır. Formülasyonlar 100 kat seyreltildikten sonra, bakır grid üzerine damlatılmış ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Daha sonra gridler 120 kV’de görüntülenmiştir. Analiz, Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan DAYTAM’da gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.5. pH Tayini

NE formülasyonlarının (B-NE ve HRM-NE) pH değerleri, pH metre kullanılarak 3’er kez ölçülmüş ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir.

3.2.4.6. FT-IR Analizi

HRM ve nanoemülsiyon formülasyonlarının FT-IR spektrumları 4000-400 cm⁻¹ aralığında alınmıştır.

3.2.4.7. NE formülasyonlarındaki HRM İçeriğinin Tayini

HRM-NE formülasyonundaki HRM miktarının belirlenmesi amacıyla 0.25 g formülasyon balon jojeye tartılmış ve hacim metanol ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda 500 rpm’de 15 dk karıştırıldıktan sonra membran filtreden (PTFE; 0.45 süzülerek valide edilmiş HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.2.4.8. *In Vitro* Salım Çalışması

HRM-NE formülasyonundan HRM salımının değerlendirilmesinde diyaliz torbası yöntemi kullanılmış ve çalışma iki farklı salım ortamında [pH 1.2 HCl veya pH 6.8 fosfat tamponu (PB)] gerçekleştirilmiştir. Diyaliz torbalarına 1’er mL HRM-NE formülasyonu konularak içinde 50 mL salım ortamı (pH 1.2 HCl veya pH 6.8 PB) olan şişelere yerleştirilmiştir. Şişeler yatay çalkalayıcılı su banyosuna (37±0.5 °C; 50 rpm) konularak belirlenen zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 4, 8, 12 ve 24. saatler) salım ortamlarından 1’er mL örnek alınmış ve yerlerine aynı sıcaklıktaki taze salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan örnekler 0.45 µm por açıklığına sahip membran filtreden (PVDF) süzülerek valide edilmiş HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.2.5. *In Vivo* Çalışmalar

Çalışma Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi

(ATADEM)’nden temin edilen ve ağırlıkları yaklaşık 180-220 g arasında değişen 86 adet Albino Wistar erkek sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney öncesi ve deney bitene kadar sınırsız yem (standart diet) ve içme suyu (musluk suyu) verilen sıçanlar 12/12 saat karanlık /aydınlık periyodunda ve oda sıcaklığında (24 ± 2 °C) kendilerine ait oda ve kafeslerde gruplar halinde bakılmıştır. Çalışmada deney hayvanlarının kullanımına ilişkin Ulusal Sağlık Enstitüsü Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı için önerilen kılavuz ilkeleri kurallarına uyulmuştur. Bu çalışmanın tüm aşamalarının 25.11.2021 tarih ve 242 no’lu Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kararı ile etik kurallarına uygun olduğu onaylanmıştır.

3.2.5.1. STZ-NA ile Diyabet Modeli Oluşturma

Sıçanlarda diyabet modeli daha önce yayınlanmış olan literatürlerde yer alan diyabet modeli geliştirme yöntemlerinin modifiye edilip kullanılması ile oluşturulmuştur (Ghasemi ve ark., 2014; Szkudelski, 2012; Sayeli ve Shenoy, 2021). STZ uygulamadan önce gruplar halinde ayrı kafeslerde bulunan sıçanlara yalnızca içme suyu verilmiş ve 12 saat boyunca aç bırakılmışlardır. Daha sonra sıçanların başlangıç ağırlıkları belirlenmiş ve bazal kan glukoz değerleri (mg/dL) glukometre (On Call Plus kan glukoz monitörü) ile ölçülmüştür. Tip II diyabet modeli oluşturmak amacıyla ilk olarak uygulama öncesi taze hazırlanan nikotinamid (NA)’in % 0.9’luk NaCl’ deki çözeltisi (1 mL; 110 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak sıçanlara uygulanmıştır. Bu uygulamadan 15 dk sonra yine uygulama öncesi taze hazırlanan sitrat tamponu (pH: 4,5) içinde STZ çözeltisi (1 mL; 60 mg/kg) i.p. olarak sıçanlara uygulanmıştır. Diyabet oluşturulmayan sıçan gruplarına ise aynı miktarda sitrat tamponu verilmiştir. STZ uygulamasından sonra pankreastan çok fazla bir şekilde insülin salgılanacağı düşünüldüğü için öldürücü hipoglisemi oluşması olasılığını önlemek amacıyla sıçanlara STZ uygulamasından 4-6 saat sonra 24 saat süreyle % 5 glukoz solüsyonu içme sularına katılarak verilmiştir. 72 saat sonra sıçanların

kuyruk veninden alınan kan örnekleri On Call Plus kan glukoz monitörü ile değerlendirilerek açlık kan şekerleri ölçülmüş ve glukoz seviyeleri 200 mg/dL'nin üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir.

3.2.5.2. Deneysel Tasarım

Deneyde Albino Wistar erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlardan bir kısmı deney öncesi ön çalışma için kullanılarak yapılan bu çalışmalar sonucunda, literatürle de uyumlu olacak şekilde dozların 5, 10 ve 15 mg/kg olmasına karar verilmiştir (Fortunato ve ark., 2009). Geriye kalan hayvanlar gruplarda 7 hayvan olacak şekilde 12 gruba ayrılmıştır.

GRUPLAR	
SK	: Sağlıklı kontrol grubu
DK	: Diyabetik kontrol grubu
HRM 15	: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz kontrol grubu
HRM-NE 15	: HRM yüksek doz içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup
B-NE	: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon
D-BNE	: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon
D- HRM 5	: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup
D- HRM 10	: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup
D-HRM 15	: Diyabetik sıçan grubu + 15 mg/kg HRM uygulanan grup
D- HRM-NE 5	: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup
D- HRM-NE 10	: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup
D- HRM-NE 15	: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup

3.2.5.3. HRM ve HRM-NE'nin Sıçanlara Uygulanması, Numunelerin

Hazırlanması

Diyabet oluşturulduktan sonra sıçanlarda ilaç uygulamasına geçilmiştir. İlaç

uygulanmasına başlandıktan sonra 7, 14 ve 21. günlerde sıçanlardan kuyruk veninden kan alınarak kan şekerleri ölçülmüştür. HRM ve HRM-NE hazırlanarak, sıçanlara 21 gün boyunca intragastrik gavaj yardımıyla günde tek sefer ve hergün aynı saatte uygulanmıştır. Sağlıklı ve diyabet kontrol gruplarına ise sadece yem ve içme suyu verilmiştir. 21. günün sonunda Ketamin/Ksilazin (40/10 mg/kg) uygulanarak ötanazi edilen tüm sıçan gruplarından intrakardiyak kan örnekleri ve karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Alınan karaciğer dokuları ikiye ayrılarak, biyokimyasal ve histopatolojik analizlerde kullanılmıştır. Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan karaciğer dokuları bir gün -20 °C’de bekletildikten sonra analiz gününe kadar -80°C’ de muhafaza edilmiştir. Histopatolojik analizlerde kullanılacak olan karaciğer dokuları ise %10’luk formaldehit solüsyonuna konularak analiz edilen güne kadar bekletilmiştir. Biyokimyasal analizlerde kullanılan karaciğer dokuları %0.9’luk sodyum klorür (NaCl) çözeltisinde yıkanarak ayrı ayrı petri kaplarına koyulmuştur. Kan örnekleri ise vakumlu biyokimya tüplerine alınıp oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilip daha sonra 3500 rpm de 10 dk soğutmalı santrifüjde santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum örnekleri bir gün -20 °C’de bekletildikten sonra AST ve ALT biyokimyasal parametreleri bakılmak için kullanılmıştır.

3.2.5.4. Sıçanların Kan Glukoz Seviyelerinin Belirlenmesi

Çalışmada deneyin 0, 7, 14 ve 21. günlerinde sıçanların kuyruk veninden kan alınarak kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Kan örnekleri On Call Plus kan glukoz monitörü ile değerlendirildi. Kan glukoz seviyeleri mg/dL olarak ifade edilmiştir.

3.2.5.5. Sıçanların Vücut Ağırlıklarının Belirlenmesi

Sıçanlar deneyin 0, 7, 14 ve 21. günlerinde tartılarak vücut ağırlıkları kaydedilip bu ağırlıklara göre verilecek olan ilaç dozları ayarlanmıştır.

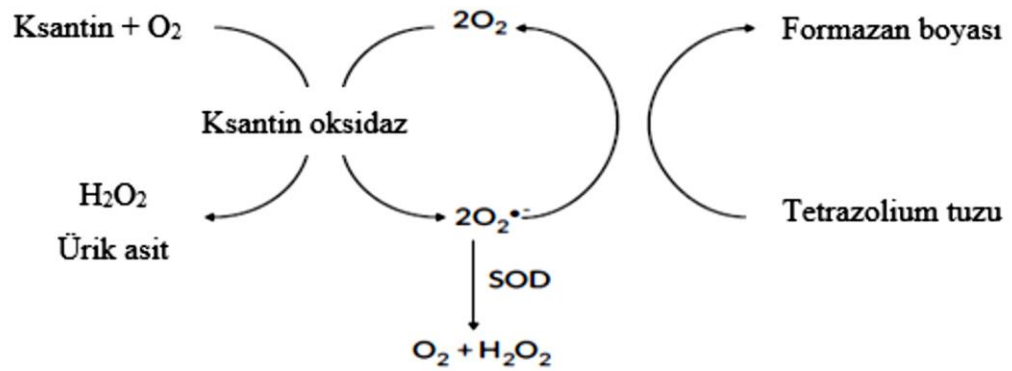
3.2.6. Biyokimyasal Analiz

3.2.6.1. AST ve ALT Ölçümü

Deney sonunda sıçanlardan alınan kanlardan elde edilen serum örneklerinden Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alanin Aminotransferaz (ALT) biyokimyasal parametreleri Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkezi laboratuvarında Randox Monaco otoanalizörü ile analiz edilmiştir.

3.2.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini

Kullanılan SOD ölçüm kitindeki (Cayman Chemical Company; Catalog No: 706002) yöntem Şekil 3.5’de gösterilmiştir. Yöntem ksantin, ksantin oksidaz ile ürik aside dönüşümü esnasında ortaya çıkan süperoksit anyonunun SOD ile dismutasyonu sırasında ortama eklenen tetrazolyum tuzunun formazana dönüşmesi ile meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak 450 nm’de ölçümüne dayanmaktadır (Cayman Chemical Company., n.d.-c).



Şekil 3.5. SOD ölçüm şeması

SOD Tayini İçin Kullanılan Reaktifler

Ölçüm tamponu (10X): Kitde 5 mL ölçüm tamponu bulunmaktadır. Bu ölçüm tamponundan 3 mL alınarak üzerine 27 mL ultra saf su ilave edilip 1X çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti, radikal dedektörün seyreltilmesi için kullanılmıştır.

Örnek tamponu (10X): Kit içerisinde 5 mL örnek tamponu bulunmaktadır. Örnek tamponundan 2 mL alınarak 18 mL ultra saf su ilave edilip 1X çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti SOD standartlarının hazırlanması, ksantin oksidaz ve SOD numunelerinin seyreltilmesi için kullanılmıştır.

Radikal dedektör: Kit içinde bulunan 250 µL tetrazolyum tuzu çözeltisinden 50 µL alınarak üzerine 19.95 mL ölçüm tamponu ilave edilip seyreltilmiştir. Bu çözelti ışığa karşı duyarlı olduğu için çalışma esnasında alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunmuştur.

SOD standart: Kitde 100 µL bovin eritrosit SOD (Cu/Zn-SOD şeklinde) bulunmaktadır. Bu çözeltiden 20 µL alınarak üzerine 1.98 mL 1X örnek tamponu ilave edilmiş ve SOD stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bekleme esnasında buz içerisinde muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu stok çözeltiden sırası ile 0, 20, 40, 80, 120, 160 ve 200 µL alınmış ve 1X örnek tamponu ile toplam hacim 1000 µL olacak şekilde seyreltilmiştir. Sonuç olarak 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 U/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler elde edilmiştir.

Ksantin oksidaz: Kit içerisinde 3 şişe 150 µL ksantin oksidaz bulunmaktadır. 50 µL ksantin oksidaz alınarak üzerine 1.95 mL 1X örnek tamponu ilave edilerek seyreltilmiştir. Bekletme sırasında buz içinde muhafaza edilmiştir.

SOD Ölçümü ve Aktivitesinin Hesaplanması

Karaciğer dokusunda SOD tayini için, her bir doku örneği (75 mg), 1mM etilen glikol tetra asetik asit (EGTA), 210 mM mannitol ve 70 mM sükroz içeren 20 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1- piperazinetansülfonik asit) (pH 7.2) tamponunda (750 µL) TissueLyser II (Almanya) cihazı kullanılarak (30.0 1/s frequency; 30+30 sn) homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenatlar +4 °C ve 1500 g'de 5 dk santrifüj edilerek elde edilen

süpernatantlarda SOD aktivitesi tayin edilmiştir (Cayman Chemical Company; Catalog No: 706002). Ölçüm için izlenen yol aşağıda verilmiştir.

- Kuyucuklara 200 µL seyreltilmiş radikal dedektör ve 10 µL süpernatant veya SOD standardı eklenmiştir.
- Sonrasında reaksiyonu başlatmak için tüm kuyucuklara 20 µL seyreltilmiş ksantin oksidaz eklenmiştir.
- Plate üzeri kapatılarak çalkalayıcıda, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilip 450 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

Ölçülen standart ve örnekler için ait absorbans değerlerinin ortalaması hesaplanmıştır. SOD aktivitesi 0 U/mL olan standarda ait absorbans değeri, kendisine ve diğer elde edilen absorbans değerlerine (standart ve örnek) bölünüp linearize oran (LR) değerleri bulunmuştur. Bulunan linearize oranlar (LR), standartların SOD aktivitesine karşı grafiğe geçirilmiş ve standart eğri ile denklemi bulunmuştur. Bu denklemden faydalanan örneklerin SOD aktiviteleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Cayman Chemical Company., n.d.-c).

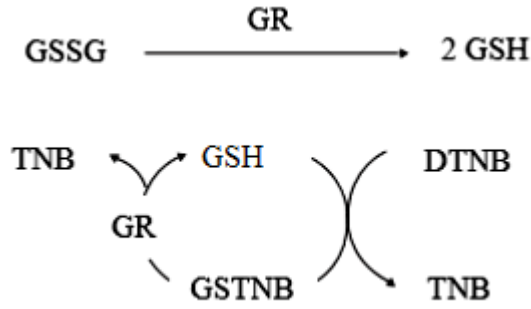
$$\text{SOD (U/mL)} = \frac{((\text{örnek LR-y-girişim}))}{\text{Eğim}} \times \frac{0.23 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}}$$

Şekil 3.6. SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan eşitlik

Daha sonra ise sonuçlar mg protein değerlerine bölünmüş ve örnek aktiviteleri U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.3. Glutasyon (GSH) Tayini

GSH ölçüm kitindeki (Cayman Chemical Company; Catalog No: 703002) yöntemin esası Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Bu yöntem, GSH'nin sülfidril gruplarının DTNB ile tepkimeye girerek sarı renkli TNB'ye dönüşmesi ve oluşan renk şiddetinin 405 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Cayman Chemical Company., n.d.-a).



Şekil 3.7. GSH ölçüm şeması

GSH Tayini İçin Kullanılan Reaktifler

GSH MES Tamponu (2X): Kitde bulunan 60 mL 0.4 M MES tamponu (pH 6.0) 60 mL ultra saf su ile seyreltilip 1X MES tamponu hazırlanmıştır.

GSSG Standart: Kit içerisinde MES tamponu içerisinde hazırlanmış 2 mL 25 µM GSSG kullanıma hazır bir şekilde bulunmaktadır. Standart çözeltilerin hazırlanmasında bu çözeltiden sırası ile 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 ve 160 µL alınmış ve toplam hacim 500 µL olacak şekilde 1X MES tamponu ile seyreltilmiştir. Sonuç olarak 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 µM derişimlerinde standart çözeltiler elde edilmiştir. Bu standart çözeltiler sırasıyla 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 ve 16 µM total GSH'a eşdeğerdir.

GSH Ko-faktör karışımı: Kit içinde bulunan vial liyofilize halde NADP⁺ ve glukoz-6-fosfat karışımı içermektedir. Bu karışıma 0.5 mL ultra saf su ilave edilip çözeltisi hazırlanmıştır.

GSH-Enzim Karışımı: Kit içerisinde 0.2 mL glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat içeren tampon çözelti bulunmaktadır. Bu çözelti üzerine 2 mL 1X MES tamponu eklenerek seyreltilmiştir.

GSH DTNB: Kit içerisinde DTNB liyofilize halde bulunmaktadır. Viale 0.5 mL ultra saf su eklenerek iyice karıştırılmış ve bu çözelti 10 dk içerisinde kullanılmıştır.

GSH Ölçüm Tamponu (kokteyl): 11.25 mL 1X MES tamponu, 0.45 mL ko-faktör karışımı, 2.1 mL enzim karışımı, 2.3 mL ultra saf su ve 0.45 mL DTNB karıştırılarak hazırlanmıştır.

GSH Ölçümü ve Hesaplanması

GSH tayini için, her bir karaciğer doku örneği (75 mg), 1mM EDTA içeren pH 6.0-7.0 50 mM soğuk fosfat tamponunda (750 µL) TissueLyser II (Almanyada) cihazı kullanılarak (30.0 1/s frequency; 30+30 sn) homojenize edilmiştir. Homojenize edildikten sonra homojenatlar +4 °C ve 10000 g'de 15 dk santrifüj edilerek oluşan süpernatantlardan GSH seviyeleri belirlenmiştir (Cayman Chemical Company; Catalog No: 703002). Ölçüm için izlenen yol aşağıda verilmiştir.

- Kuyucuklara 50 µL standart çözelti veya süpernatant pipetlenmiş ve ardından tüm kuyucuklara 150 µL kokteyl eklenmiştir.
- Işıktan korumak için plate, koruyucu film ile kapatılıp çalkalayıcıda 25 dk inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra 405 nm absorbans değerleri ölçülmüştür.

GSH seviyelerinin hesaplanabilmesi için öncelikle elde edilen absorbans değerlerinden 0 µM derişimdeki standardın absorbans değerleri çıkarılarak yeni absorbans değerleri elde edilmiştir. Standartların konsantrasyonları ve yeni absorbans değerleri grafiğe geçirilip bir standart eğrisi ve denklemi elde edilmiştir. Bu denklemden faydalanarak örneklerin GSH seviyeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Cayman Chemical Company., n.d.-a).

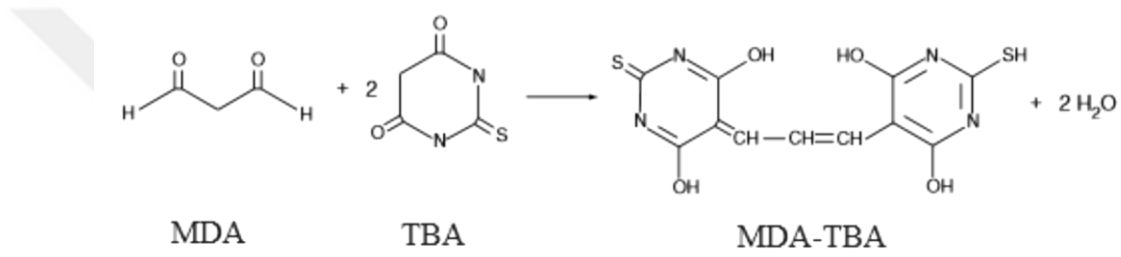
$$[\text{Total GSH } \mu\text{M/mg doku}] = \left[\frac{(\text{örneğin } i - \text{eğimi}) - (Y - \text{girişim})}{f - \text{eğimi}} \right] \times 2 \times \text{örnek dilüsyonu}$$

Şekil 3.8. GSH seviyesini belirlemek için kullanılan eşitlik

Elde edilen sonuçlar mg protein değerlerine bölünerek örnek aktiviteleri nmol/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.4. Malondialhehit (MDA) Tayini

Kullandığımız MDA ölçüm kitinin (Cayman Chemical Company; Catalog No: 10009055) yöntem esası Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bu yöntem, MDA ve TBA’nın yüksek sıcaklıklarda (90-100 °C) ve asidik koşullarda reaksiyona girmesi ile oluşan renkli MDA-TBA kompleksinin 540 nm’de kolorimetrik ölçümüne dayanmaktadır (Cayman Chemical Company., n.d.-d).



Şekil 3.9. MDA-TBA oluşum mekanizması

MDA Tayini İçin Kullanılan Reaktifler

Tiyobarbitürik Asit: Kitde 2 g tiyobarbitürik asit (TBA) bulunmaktadır. Bu renk reaktifini hazırlamak için kullanılmıştır.

Asetik Asit: Kit içinde her birinde 20 mL derişik asetik asit olan 2 vial bulunmaktadır. 40 mL asetik asit, 160 mL ultra saf su ile seyreltilerek renk reaktifinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sodyum Hidroksit (10X): Kit içinde 20 mL sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi bulunmaktadır. Bu çözelti 180 mL ultra saf su ile seyreltilmiş ve renk reaktifinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

MDA Standart: Kit içerisinde 500 µM’lık MDA stok çözeltisi kullanım için hazır şekilde bulunmaktadır. Standart hazırlanmasında kullanılmıştır. İlk olarak 250 µL MDA standart alınıp, 750 µL ultra saf su ile seyreltilmiş ve ikinci stok çözelti hazırlanmıştır.

Daha sonra ikinci stok çözeltiden sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80, 200 ve 400 μL alınarak hacimleri 1000 μL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilmiştir. Sonuç olarak 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 25 ve 50 μM derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir.

SDS Çözeltisi: Kullanıma hazır halde SDS çözeltisi kit içerisinde bulunmaktadır.

Renk Reaktifi: 530 mg TBA tartılıp 250 mL'lik behere alınmış ve 50 mL seyreltik asetik asit ile 50 mL seyreltik sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra manyetik karıştırıcıda tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır.

MDA Ölçüm Yöntem ve Hesaplanması

MDA tayini için, her bir karaciğer doku örneği (75 mg), RIPA tamponunda (750 μL) buz banyosunda ultrasonik prob kullanılarak (%40, 15 sn) homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenatlar +4 $^{\circ}\text{C}$ ve 1600 g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatantlar MDA tayini için kullanılmıştır (Cayman Chemical Company; Catalog No: 10009055). Ölçüm için izlenen yol aşağıda verilmiştir.

- Cam tüplere 100 μL standart çözelti veya süpernatant pipetlenmiştir.
- Her tüpe 100 μL SDS çözeltisi eklenerek hızlıca karıştırılmıştır.
- Daha sonra her tüpe 4 mL renk reaktifi eklenerek tüpler yavaşça ters düz edilmiştir.
- Tüpler su banyosunda (100 $^{\circ}\text{C}$) bir saat boyunca bekletilmiştir.
- 1 saat beklendikten sonra reaksiyonu sonlandırmak için tüpler buz banyosuna konulup 10 dk bekletilmiştir.
- 10 dk bekleme sonrasında tüpler +4 $^{\circ}\text{C}$ ve 1600 g'de 10 dk santrifüj edilip 30 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Standart ve örneklerden 150 μL alınıp kuyucuklara konulmuş ve 540 nm'de absorbansları ölçülmüştür.

MDA seviyelerini hesaplayabilmek için ilk olarak elde edilen tüm absorbans değerlerinden 0 µM derişimdeki standardın absorbans değerleri çıkarılıp yeni absorbans değerleri bulunmuştur. Standartların konsantrasyonları ve yeni absorbans değerleri grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi elde edilmiştir. Bu denklem kullanılarak örneklerin MDA seviyeleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Cayman Chemical Company., n.d.-d).

$$\text{MDA } (\mu\text{M}) = \frac{(\text{540 nm'deki absorbans})-(\text{y-girişim})}{\text{eğim}}$$

Şekil 3.10. MDA seviyesini hesaplamak için kullanılan eşitlik

Sonuçlar mg protein değerlerine bölünüp MDA seviyesi nmol/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.5. Protein Tayini

Protein tayini için kullanılan kit (Cayman Chemical Company; Catalog No: 704002) mikropalak tabanlı total protein miktarını belirlemek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, Bradford metoduna dayanır. Coomassie® boyası, asidik ortamda proteine bağlandığında rengi kahverengiden maviye döner ve bu oluşan renk şiddeti 590 nm'de kolorimetrik olarak değerlendirilir (Cayman Chemical Company., n.d.-b).

Protein Tayini İçin Kullanılan Reaktifler

Ölçüm reaktifi: Kit içerisinde bulunan ölçüm reaktifinden 7.5 mL alınarak 50 mL'ye ultra saf su ile seyreltilmiştir.

BSA Standart: Kit içinde, %0.9 tuz ve %0.05 sodyum içinde 10 mg/mL stok çözelti bulunmaktadır. Bu stok çözeltisinden 4 µL alınarak 996 µL ultra saf su ile seyreltilmiştir. Bu şekilde 40 µg/mL derişimde ikinci bir stok çözelti hazırlanmıştır. 8 tane deney tüpü A'dan H'ye kadar kodlanmış H tüpüne 200 µL, diğer tüplere ise 250 µL ultra saf su eklenmiştir. H tüpüne 40 µg/mL derişimdeki ikinci stok çözeltiden 800 µL

eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra H tüpünden 750 µL G tüpüne aktarılmış, seri dilüsyon işlemi diğer tüpler (F-B) içinde aynen tekrarlanmıştır. A tüpü ise standart eğri için kör olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak 0, 5.6, 7.5, 10.1, 13.5, 18, 24 ve 32 µg/mL derişimlere sahip standart çözeltiler elde edilmiştir.

Protein Ölçümü ve Hesaplar

Protein tayini için, her bir karaciğer doku örneği (75 mg), izotonik NaCl çözeltisi içinde (750 µL) TissueLyser II (Almanya) cihazı kullanılarak (30.0 1/s frequency; 30+30 sn) homojenize edilmiştir. Bu homojenatlar +4 °C ve 10000 g'de 15 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlardan protein seviyeleri tayin edilmiştir (Cayman Chemical Company; Catalog No: 704002). Ölçüm için izlenen yol aşağıda verilmiştir.

- Kuyucuklara 100 µL standart çözelti veya süpernatant pipetlenmiştir.
- Tüm kuyucuklara 100 µL ölçüm reaktifi eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında 595 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

Protein seviyelerinin hesaplanması için ilk olarak kör numunelerin (A) absorbans değeri elde edilen absorbans değerlerinden çıkarılmıştır. Yeni absorbans değerlerine karşı standart konsantrasyonları grafiğe geçirilmiş standart eğri ve denklemi ($y = Ax^2 + Bx + C$) elde edilmiştir. Bu denklem kullanılarak örneklerde protein tayini aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Cayman Chemical Company., n.d.-b).

$$\text{Protein } (\mu\text{g/mL}) = [A * (\text{numune abs})^2 + B * (\text{numune abs}) + C] * \text{dilüsyon katsayısı}$$

Şekil 3.11. Protein miktarını hesaplamak için kullanılan eşitlik

3.2.7. Histolojik Prosedür

Histolojik çalışmalar Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ tarafından gerçekleştirilmiştir.

STZ-NA ile diyabet yapılan sıçanların cerrahi eksizyon ile karaciğer dokuları alınıp %10'luk tamponlu formaldehit içine konulmuştur. Kırk sekiz saatlik fiksasyondan sonra dokular sırasıyla, %50, 70, 80, 96 ve 100'lük etanol serilerinden ve ksilenden geçirildi. Daha sonra 56-58 °C'de eriyik haldeki iki ayrı parafin içinde infiltrasyon işlemi yapılarak dokular parafin bloklara gömülmüştür. Bu hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınmış hematoksilin-eozin (H-E) boyama protokolüne göre boyanmıştır. Boyama işleminden sonra kamera ataçmanlı ışık mikroskop (Nicon Eclips E600, Japan) ile histolojik olarak incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulguların istatistiksel analizleri SPSS Statistics Version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma (SS) şeklinde verilmiştir. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of Variance (ANOVA)" testi ile belirlendi ve $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi kullanılmıştır.

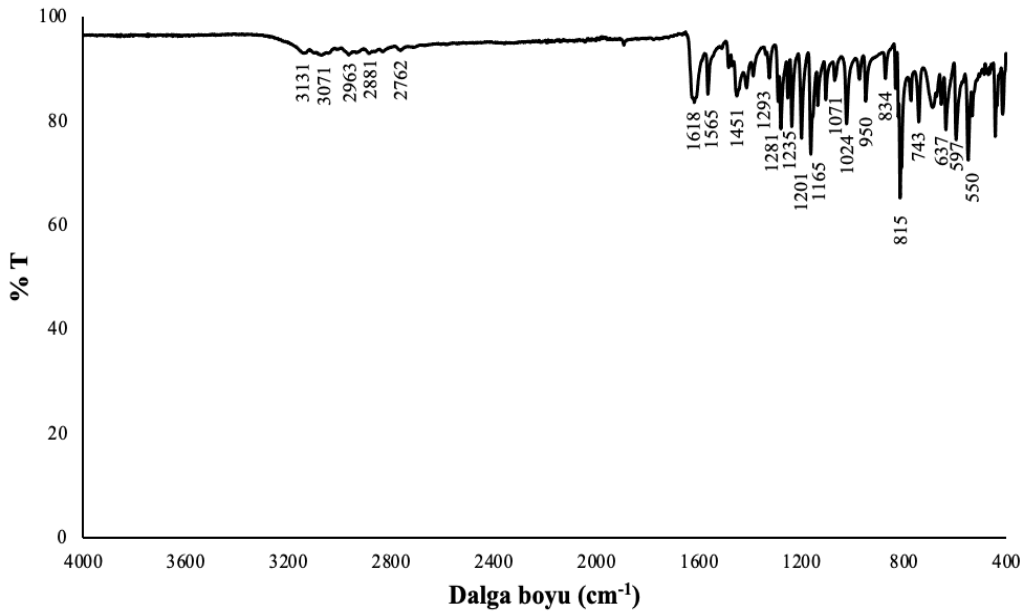
4. BULGULAR

4.1. HRM'nin Fizikokimyasal Özellikleri

HRM'in fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için FT-IR ve UV spektrumları alınmıştır.

4.1.1. HRM'nin FT-IR Spekturumu

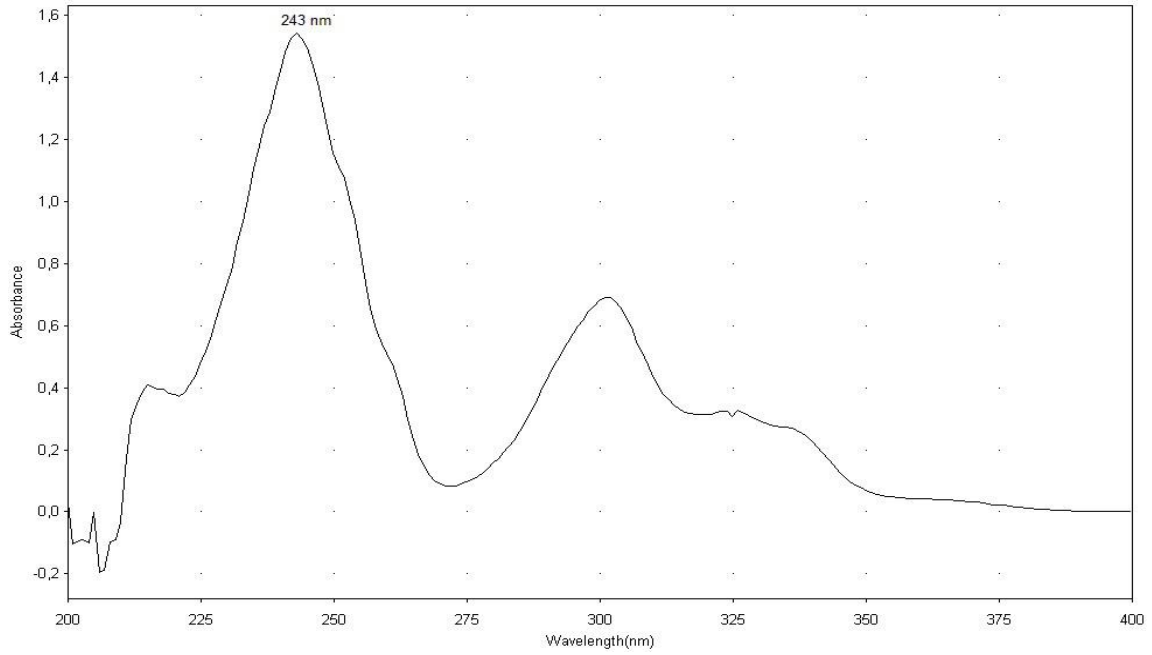
FT-IR analizi ile yapıdaki çeşitli bağların titreşim frekansları ölçülerek yapıdaki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinilmektedir. HRM'nin FT-IR spekturumu (Şekil 4.1) incelendiğinde; 3200-2800 cm^{-1} aralığında aromatik C-H titreşimleri, 2762 cm^{-1} 'de alifatik C-H titreşimleri, 1650-1300 cm^{-1} aralığında C=C (aromatik yapıda) titreşimleri, 1618 cm^{-1} 'de aromatik C=N titreşimi, 1565 cm^{-1} 'de N-H titreşimleri, 1165 ve 1024 cm^{-1} 'de O-CH₃ titreşimi görülmektedir. Elde edilen bulgular literatür ile uyumludur (Niazi ve ark., 2021).



Şekil 4.1. HRM'ye ait FT-IR spekturumu

4.1.2. HRM'nin UV Spekturumu

HRM'nin UV spektrumunu almak için Bölüm 3.2.1.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılmış ve HRM'nin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 243 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).

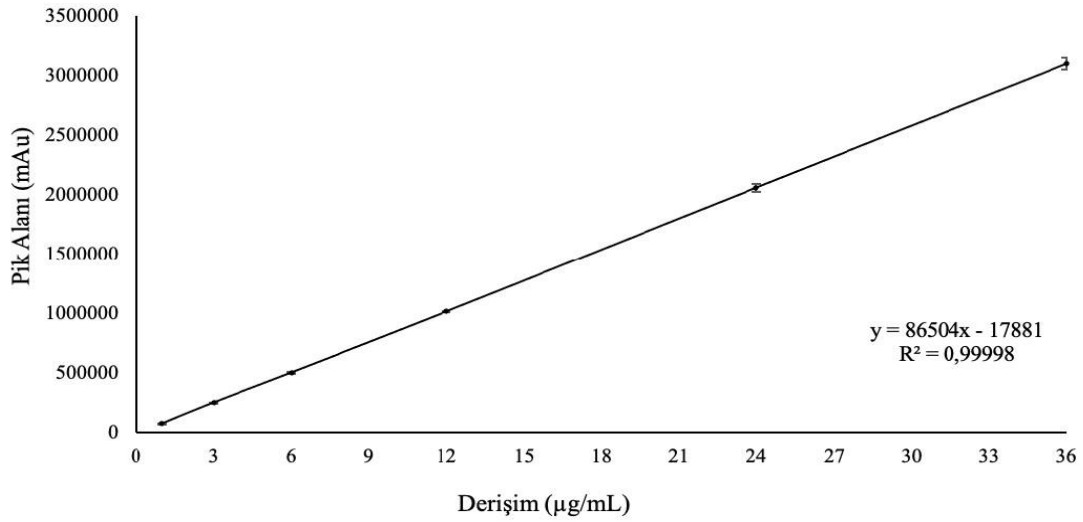


Şekil 4.2. HRM'nin UV spektrumu

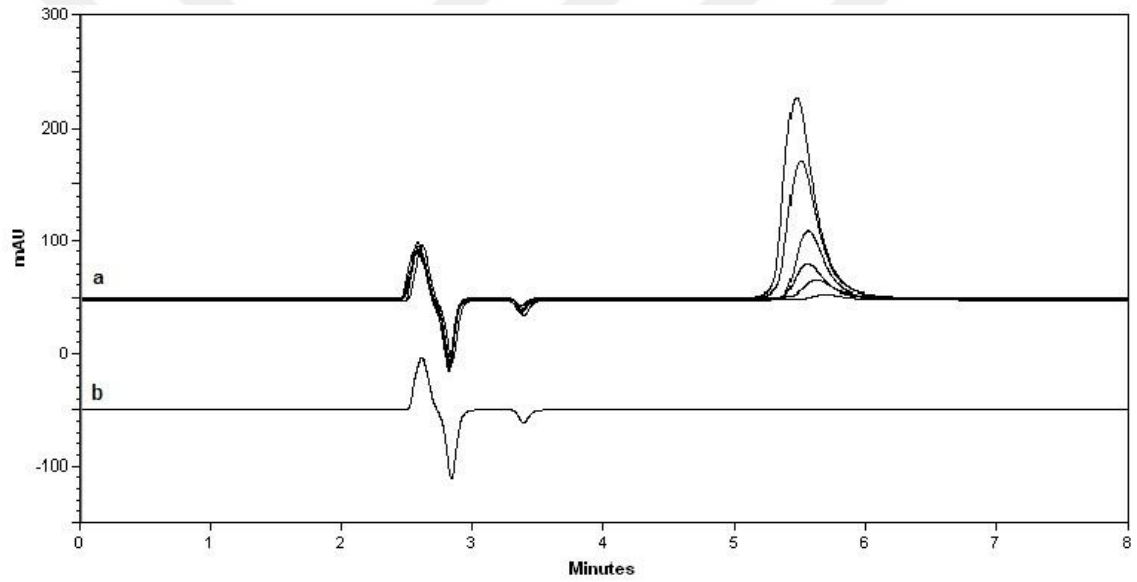
4.2. HRM'nin HPLC Yöntemiyle Miktar Tayini

4.2.1. HRM'ye ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi

HRM'ye ait kalibrasyon doğrusu, 6 farklı derişimde 6 farklı seri üzerinden çalışılarak elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.3'de, HRM'ye ait kromatogramlar ise Şekil 4.4'de verilmiştir. HRM için alıkonma zamanı 5.5 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. HRM'nin HPLC yöntemiyle bulunan kalibrasyon doğrusu ve denklemi



Şekil 4.4. Artan derişimlerdeki (1-36 µg/mL) HRM'ye ait kromatogramlar (a) ve metanole ait kromatogram (b).

4.2.2. Analitik Yöntemin Geçerlilik Bulguları

4.2.2.1. Doğrusallık

HRM'nin metanol içindeki 50 µg/mL derişimindeki stok çözeltiden hareketle, uygun seyreltmeler metanol ile yapılarak, 1-36 µg/mL derişim aralığında altı farklı derişimde ve her bir derişim için 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltiler belirlenen koşullarda HPLC ile analiz edilerek her bir derişim ve bu derişime karşılık gelen pik alanları grafiğe geçirilerek regresyon analizi

yardımıyla kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi elde edilmiştir (Şekil 4.3). Tanımlayıcılık katsayısı (R^2) 0.99998 olarak bulunmuştur. R^2 değerinin 1'e oldukça yakın olması belirlenen derişim aralığında (1-36 $\mu\text{g/mL}$) doğrusallık parametresinin sağlandığını göstermektedir.

4.2.2.2. Doğruluk

Analitik yöntemin validasyonu için doğruluk parametresi gün içi ve günler arası olarak incelenmiştir. Bu amaçla, düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere 3 farklı derişimde (2, 16 ve 32 $\mu\text{g/mL}$) ve her bir derişimden 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlık derecesi % BH hesaplanarak değerlendirilmiştir. Gün içi ve günler arası olmak üzere hesaplanan % BH değerleri Tablo 4.1'de verilmiş ve tüm derişimler için hesaplanan % BH değerlerinin ± 2 'den küçük olduğu saptanmıştır.

4.2.2.3. Kesinlik

Analitik yöntemin validasyonu için kesinlik parametresi gün içi ve günler arası olarak incelenmiştir. Bu amaçla, düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere 3 farklı derişimde (2, 16 ve 32 $\mu\text{g/mL}$) ve her bir derişimden 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların birbirlerine yakınlık derecesi VK hesaplanarak değerlendirilmiştir. Gün içi ve günler arası olmak üzere hesaplanan VK değerleri Tablo 4.1'de verilmiş ve tüm derişimler için hesaplanan VK değerlerinin % 2'den küçük olduğu saptanmıştır.

Enjeksiyon tekrar edilebilirliğinin değerlendirilmesi için yine üç farklı derişimde (2, 16 ve 32 $\mu\text{g/mL}$) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltiler arka arkaya 6 kez analiz edilerek VK değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Hesaplanan VK değerlerinin % 2'den küçük olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Miktar tayini yöntemi için elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri ($X \pm SS$; $n=6$)

	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Tayin Edilen Ortalama Derişim ($\mu\text{g/mL}$) ($X \pm SS$)	Bağıl hata (%)	Varyasyon katsayısı (%)
Gün içi	2	2.031 ± 0.010	1.545	0.475
	16	16.082 ± 0.132	0.515	0.818
	32	32.104 ± 0.305	0.326	0.951
Günler arası	2	2.023 ± 0.012	1.164	0.604
	16	16.082 ± 0.061	0.514	0.379
	32	32.201 ± 0.087	0.628	0.271

X: ortalama; SS: standart sapma

Tablo 4.2. Miktar tayini yöntemi için elde edilen enjeksiyon tekrar edilebilirliği sonuçları ($X \pm SS$; $n=6$)

Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Tayin Edilen Ortalama Derişim ($\mu\text{g/mL}$) ($X \pm SS$)	Varyasyon katsayısı (%)
2	2.017 ± 0.005	0.268
16	16.060 ± 0.030	0.188
32	32.094 ± 0.198	0.198

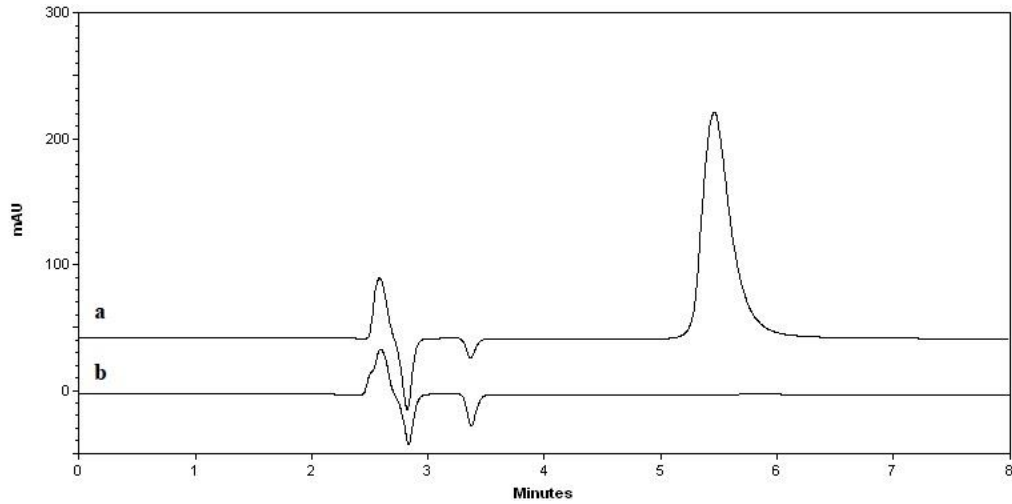
X: ortalama; SS: standart sapma

4.2.2.4. Saptanabilirlik (LOD) ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (LOQ)

LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $0.269 \mu\text{g/mL}$ ve $0.816 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir.

4.2.2.5. Özgüllük

Özgüllük parametresinin değerlendirilmesinde, metanol belirlenen şartlarda analiz edilmiş ve HRM ile aynı yerde pik vermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Özgüllük çalışmasına ait kromatogramlar: 36 µg/mL derişimdeki HRM standart çözeltisi (a), B-NE (b).

4.2.2.6. Stabilit 

HRM'nin 50 µg/mL derişimindeki stok çözeltisinden hareketle, uygun seyreltmeler metanol ile yapılarak, düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere 3 farklı derişimde (2, 16 ve 32 µg/mL) standart ç zelt ler hazırlanmış ve hazırlanan bu ç zelt ler 3 farklı sıcaklıkta (-20 °C, 2-8 °C ve 25 °C), ışıktan korunarak saklanmıştır. Daha sonra belirlenen günlerde (0., 1., 2., 3. ve 7. günlerde) analiz edilmiştir. Stabilit  parametresi % geri kazanım değerleri hesaplanarak incelenmiştir. Aktif bileşimin/etkin maddenin belirlenen koşullar altında stabil olduğunun söylenebilmesi için hesaplanan % geri kazanım değerlerinin %95-105 spesifikasyonu içinde olması istenir (Guideline, 2003; Osel ve ark., 2021; Shabir, 2003). HRM için % geri kazanım değerlerinin -20 °C, 2-8 °C ve 25 °C'de % 98.669 – % 100.456 aralığında olduğu saptanmıştır.

4.3. NE Formülasyonlarının Karakterizasyonu

4.3.1. Santrifüj Testi

B-NE ve HRM-NE formülasyonlar için santrifüj testi Bölüm 3.2.4.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve makroskobik değerlendirmede formülasyonlarda kremalaşma ve faz ayrımı olmadığı görülmüştür.

4.3.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı (PDI) ve Zeta Potansiyel Ölçümü

B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının damlacık büyüklükleri, PDI ve zeta potansiyel değerleri, 100 kat seyreltilmiş 9 farklı numune üzerinden ölçülmüş, sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. B-NE ve HRM-NE formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=9; Ort±SS)

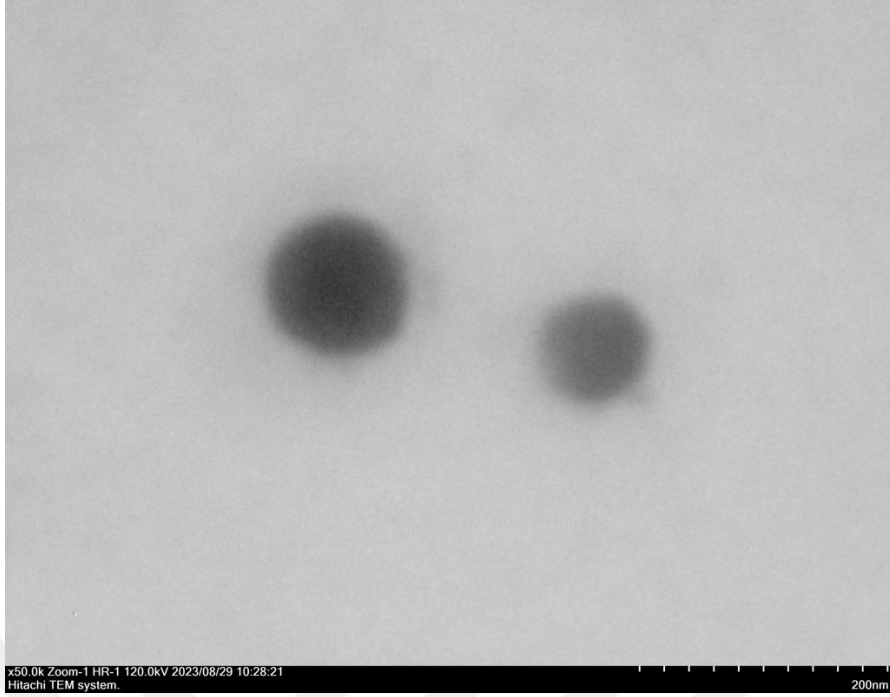
Formülasyon	Damlacık boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
B-NE	187.09 ± 3.74	0.23 ± 0.02	-32.93 ± 2.89
HRM-NE	194.07 ± 5.78	0.27 ± 0.03	-38.67 ± 2.92

Ort: ortalama; SS: standart sapma

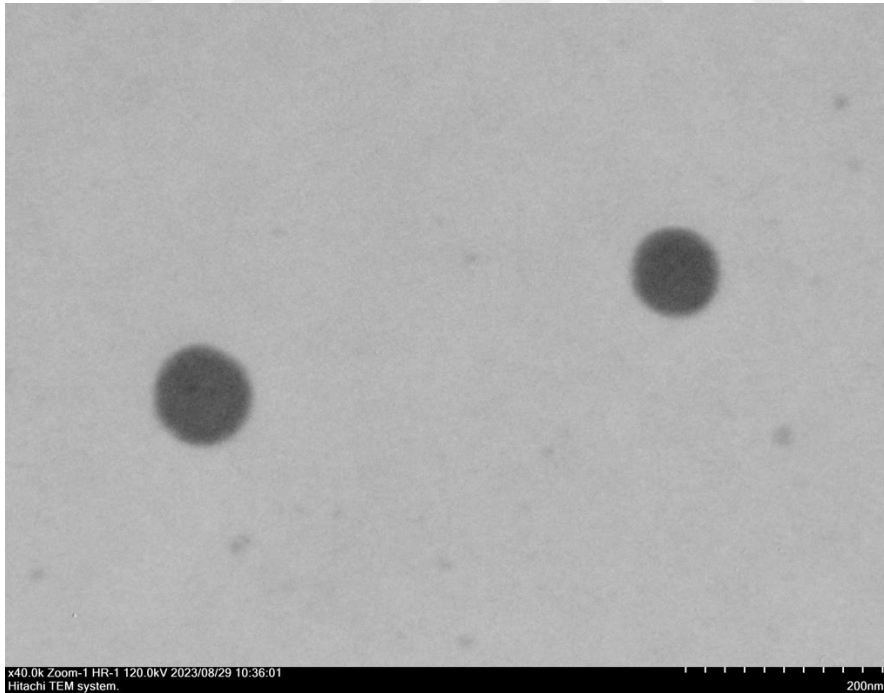
NE formülasyonlarının damlacık boyutları, PDI ve mutlak zeta potansiyel değerleri incelendiğinde HRM ilavesi ile damlacık boyutu, PDI ve mutlak zeta potansiyel değerlerinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.05$).

4.3.3. Morfolojik Analiz

B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının TEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.6. ve 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.6. B-NE formülasyonuna ait TEM görüntüsü



Şekil 4.7. HRM-NE formülasyonuna ait TEM görüntüsü

4.3.4. pH Tayini

B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının pH değerleri Tablo 4.4’de verilmiştir.

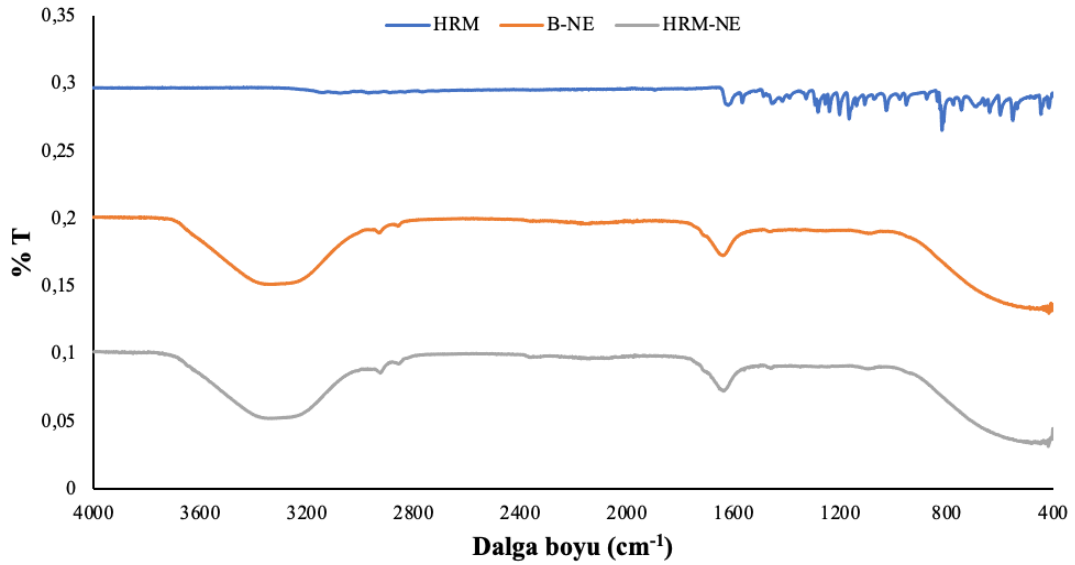
Tablo 4.4. Formülasyonlara ait pH değerleri (n=3, Ort±SS)

Formülasyon	pH
B-NE	4.30±0.02
HRM-NE	4.34±0.02

B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının pH değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.3.5. FT-IR Analizi

HRM, B-NE ve HRM-NE'ye ait FT-IR spekturumları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. HRM, B-NE ve HRM-NE'ye ait FT-IR spekturumları

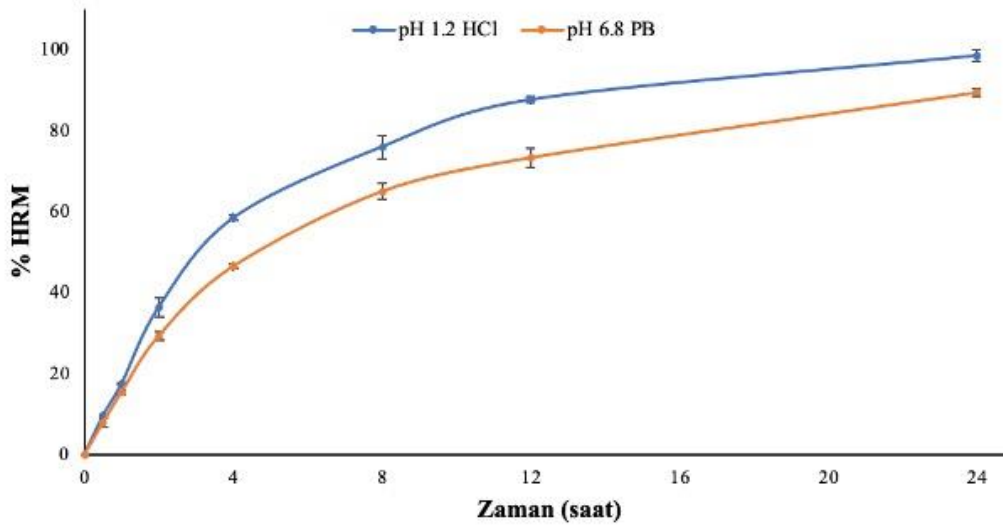
4.3.6. NE formülasyonlarındaki Harmin İçeriğinin Tayini

HRM-NE formülasyonu için % yükleme etkinliği değeri % 98.23 ±0.87 olarak saptanmıştır (n=6).

4.3.7. *In Vitro* Salım Çalışması

HRM-NE için salım çalışması iki farklı salım ortamında [pH 1.2 HCl veya pH 6.8 fosfat tamponu (PB)] gerçekleştirilmiş ve elde edilen salım profilleri Şekil 4.9'da

verilmiştir. pH 1.2 HCl tamponunda ilk 30. dk'da, 2. saatte ve 24. saatte sırasıyla % 9.63, % 36.45 ve % 98.58 HRM salımı gözlenmiştir. pH 6.8 PB'de ise ilk 30. dk'da, 2. saatte ve 24. saatte sırasıyla % 7.90, % 29.36 ve % 89.51 HRM salımı gerçekleşmiştir.



Şekil 4.9. pH 1.2 HCl ve pH 6.8 PB salım ortamlarında HRM salım profili (n=3; Ort±SS)

4.4. HRM ve HRM-NE'nin Sıçanlar Üzerine Etkisi

4.4.1. Sıçanların Vücut Ağırlık Değişimleri

Kontrol grupları ve üç farklı dozda verilen HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanmaları ile tedavi edilen grupların 0, 7, 14 ve 21. günler sonunda tartılan canlı ağırlık ortalamaları değişimi Tablo 4.5. ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

4.4.2. Kan Glukoz Seviyeleri

Kontrol grupları ve üç farklı dozda verilen HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanmaları ile tedavi edilen grupların 0, 7, 14 ve 21. günlerde kan glukoz seviyelerinin değişimi Tablo 4.6. ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Diyabet oluşturulan grupların kan glukoz seviyeleri sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, diyabet oluşturulan grupların kan glukoz seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

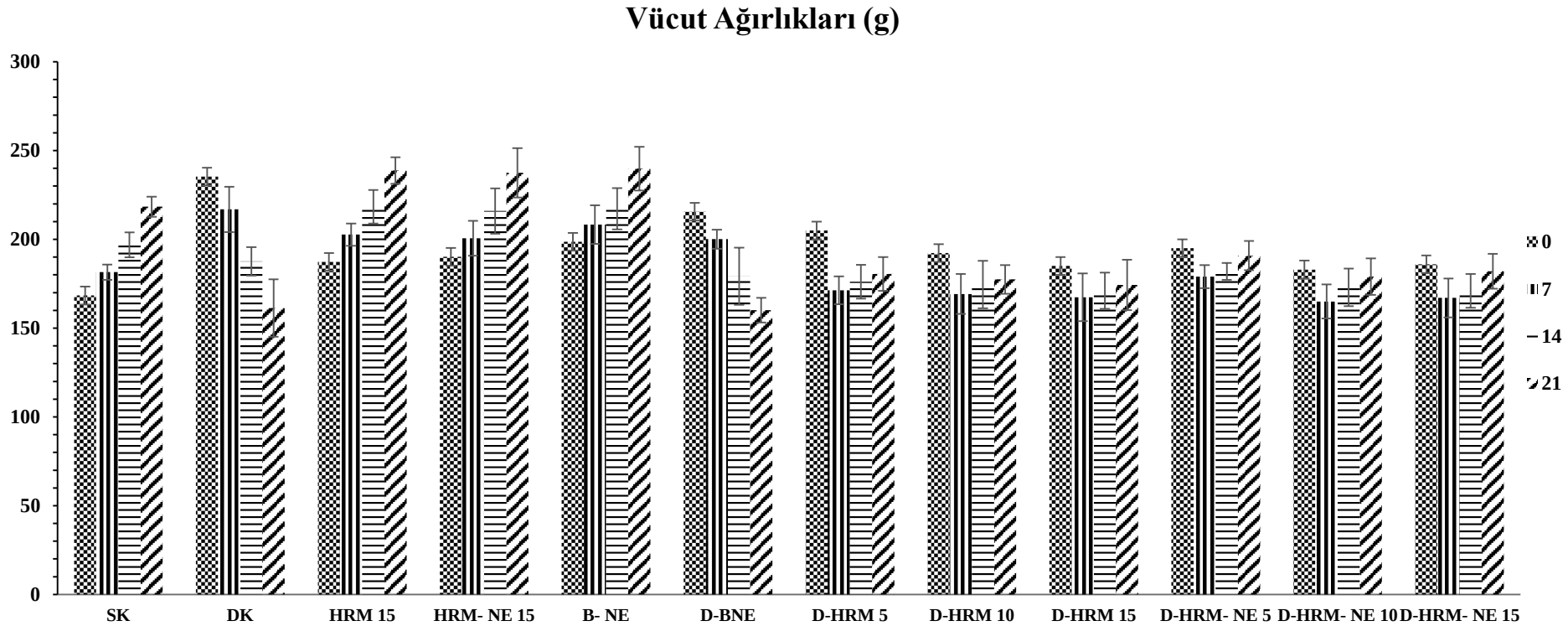
HRM'nin (D-HRM 5, D-HRM 10 ve D-HRM 15) ve HRM-NE'nin (D-HRM-NE 5, D-HRM-NE 10 ve D-HRM-NE 15) farklı üç dozunun (D-HRM 5, D-HRM 10 ve D-HRM 15) uygulandığı gruplardaki kan glukoz seviyelerinin diyabet grubuna kıyasla zamanla azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalmanın HRM ve HRM-NE uygulanan gruplarda, 0.gün ile 7. gün arasında ($p<0.05$), 7.gün ile 14. gün arasında ($p<0.05$) ve 14. gün ile 21. gün arasında ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

21. gün sonunda ise D-HRM-NE 5, D-HRM-NE 10 ve D-HRM-NE 15 uygulanan grupların kan şekeri seviyelerinin D-HRM 5, D-HRM 10 ve D-HRM 15 uygulanan gruplardan daha düşük olduğu ve D-HRM-NE 15 grubunun kan şekeri seviyesinin D-HRM 15 grubundan daha düşük olduğu ve aralarında anlamlı bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 4.5. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde vücut ağırlıkları

	0. GÜN		Tedavi 7. GÜN		Tedavi 14. GÜN		Tedavi 21. GÜN	
GRUPLAR	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS
SK	168.35	± 6.24	181.52	± 4.31	196.89	± 7.08	218.36	± 5.64
DK	235.41	± 11.56	216.87	± 12.72	187.58	± 7.98	161.32	± 16.21
HRM 15	187.25	± 5.98	202.65	± 6.27	218.36	± 9.42	238.78	± 7.47
HRM-NE 15	190.12	± 6.08	200.54	± 9.82	215.98	± 12.76	237.46	± 13.96
B-NE	198.63	± 9.27	208.35	± 10.85	217.21	± 11.58	239.85	± 12.34
D-BNE	215.58	± 13.87	200.11	± 5.33	179.23	± 16.07	160.12	± 6.89
D- HRM 5	205.00	± 7.33	171.31	± 7.83	176.14	± 9.57	180.52	± 9.46
D- HRM 10	192.26	± 6.58	169.25	± 11.28	174.59	± 13.37	177.45	± 8.10
D- HRM 15	185.00	± 10.16	167.36	± 13.48	171.02	± 10.22	174.33	± 14.25
D- HRM-NE 5	195.00	± 11.07	179.00	± 6.45	181.98	± 4.76	190.85	± 8.29
D- HRM-NE 10	183.00	± 5.61	165.00	± 9.57	173.00	± 10.58	179.00	± 10.29
D- HRM-NE 15	186.00	± 8.67	167.00	± 10.96	171.00	± 9.52	182.00	± 9.81

SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu + 15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

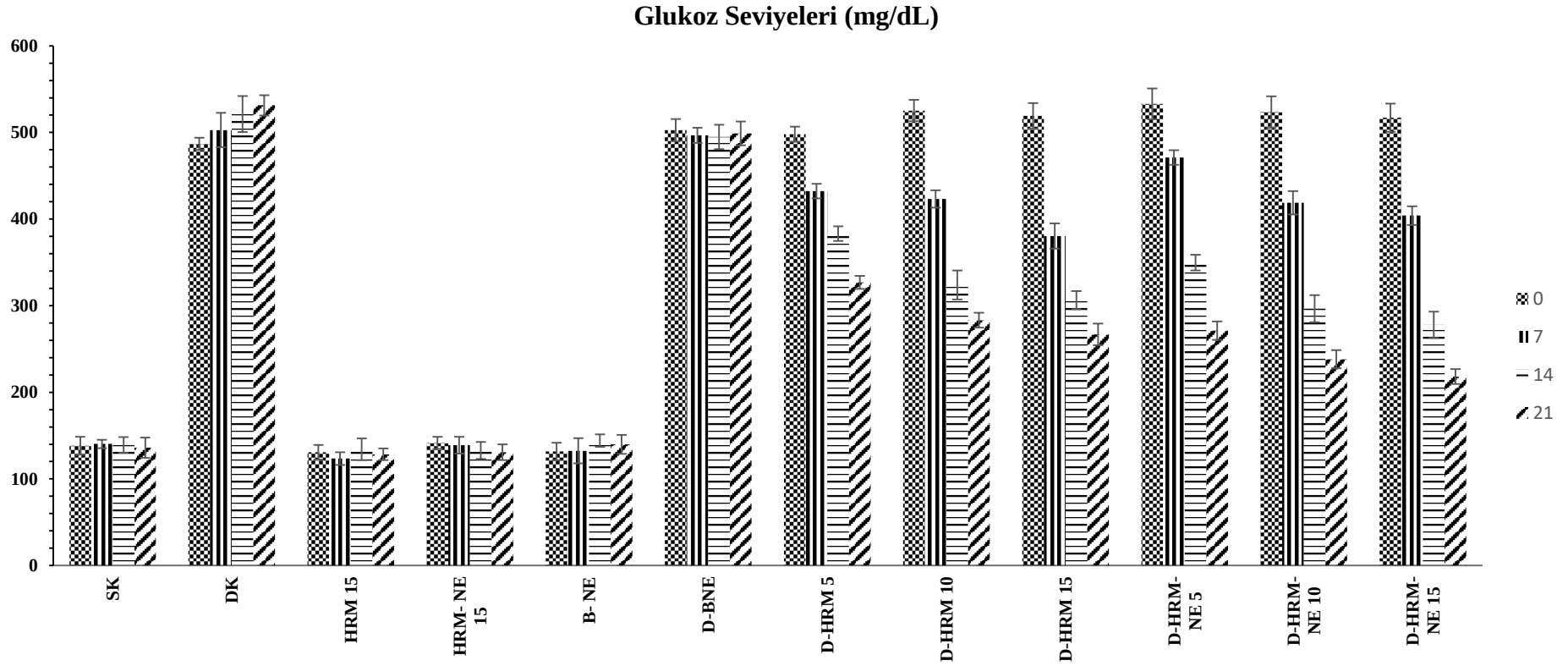


Şekil 4.10. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde ölçülen vücut ağırlıkları
 SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu + 15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup

Tablo 4.6. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde kan glukoz düzeyleri

GRUPLAR	0. GÜN		Tedavi 7. GÜN		Tedavi 14. GÜN		Tedavi 21. GÜN	
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS
SK	138.33	± 10.31	140.33	± 4.72	139.17	± 9.11	136.00	± 11.76
DK	486.75	± 7.04	502.75	± 19.97	521.30	± 20.89	531.25	± 11.70
HRM 15	130.71	± 8.42	123.43	± 7.21	134.14	± 12.44	128.43	± 6.70
HRM-NE 15	141.43	± 7.04	138.86	± 9.63	132.71	± 9.88	130.71	± 8.98
B-NE	131.57	± 10.08	132.43	± 14.56	144.29	± 7.16	139.71	± 10.93
D-BNE	502.67	± 12.88	496.67	± 8.73	494.83	± 13.98	498.83	± 13.82
D- HRM 5	498.00	± 8.79	432.29	± 8.38	383.29	± 8.46	326.86	± 7.65
D- HRM 10	525.29	± 12.42	423.29	± 10.03	323.86	± 16.74	283.14	± 8.61
D- HRM 15	519.29	± 14.71	380.43	± 14.49	306.43	± 10.42	266.71	± 12.47
D- HRM-NE 5	533.00	± 17.77	471.00	± 8.50	349.71	± 8.98	271.29	± 10.63
D- HRM-NE 10	523.43	± 18.43	418.86	± 13.56	296.57	± 15.61	238.14	± 10.51
D- HRM-NE 15	517.00	± 16.36	404.00	± 10.70	278.00	± 15.15	218.17	± 8.68

SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanaoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu + 15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.



Şekil 4.11. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası 0, 7, 14 ve 21.günlerde kan glukoz düzeyleri
 SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanaoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

4.4.3. AST ve ALT Düzeyleri

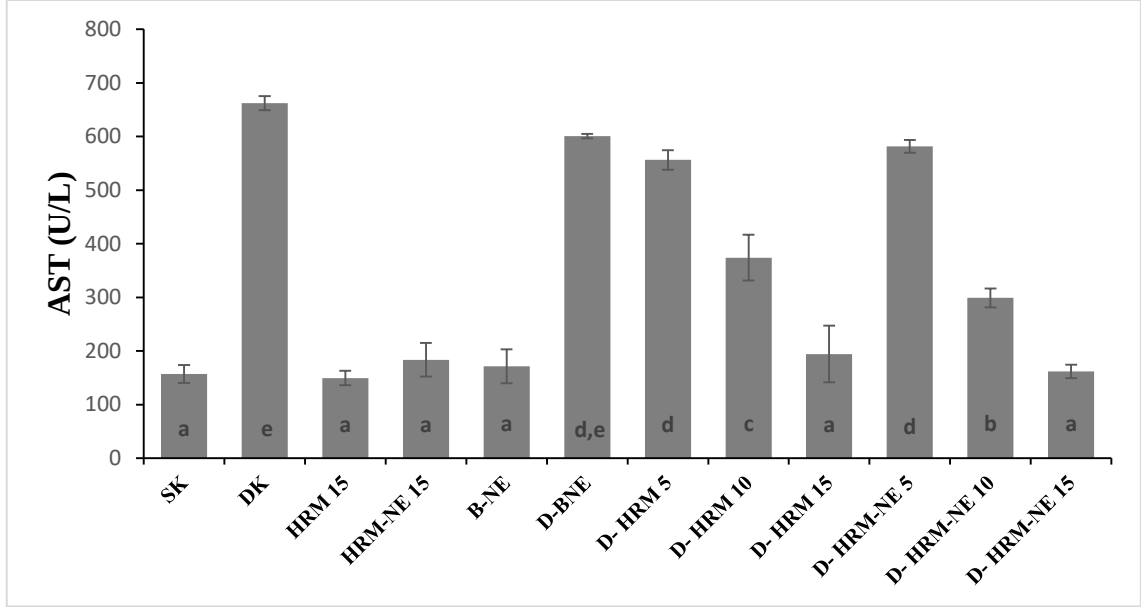
Kontrol grupları ile, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanması ile tedavi edilen grupların 21. gün sonunda alınan kan serum numunelerinde AST ve ALT düzeyleri Tablo 4.7 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası AST ve ALT düzeyleri

Gruplar	AST (U/L)	ALT(U/L)
SK	157.08 ± 16.80 ^a	76.60 ± 6.42 ^a
DK	662.20 ± 13.21 ^e	574.33 ± 5.68 ^h
HRM 15	149.60 ± 13.61 ^a	80.00 ± 11.00 ^a
HRM-NE 15	183.61 ± 31.17 ^a	69.00 ± 11.54 ^a
B-NE	171.40 ± 31.66 ^a	69.60 ± 6.54 ^a
D-BNE	601.00 ± 4.24 ^{d,e}	532.00 ± 24.37 ^a
D- HRM 5	556.40 ± 18.12 ^d	472.80 ± 20.50 ^f
D- HRM 10	374.18 ± 42.86 ^c	350.00 ± 29.73 ^d
D- HRM 15	194.38 ± 52.83 ^a	262.33 ± 27.44 ^c
D- HRM-NE 5	581.58 ± 12.09 ^d	455.40 ± 20.51 ^e
D- HRM-NE 10	299.00 ± 17.50 ^b	309.00 ± 19.42 ^d
D- HRM-NE 15	162.00 ± 12.57 ^a	177.00 ± 14.52 ^b

SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu + 15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

Kontrol grupları ile, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanması ile tedavi edilen grupların 21. gün sonunda alınan kan serum numunelerinde AST düzeyleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



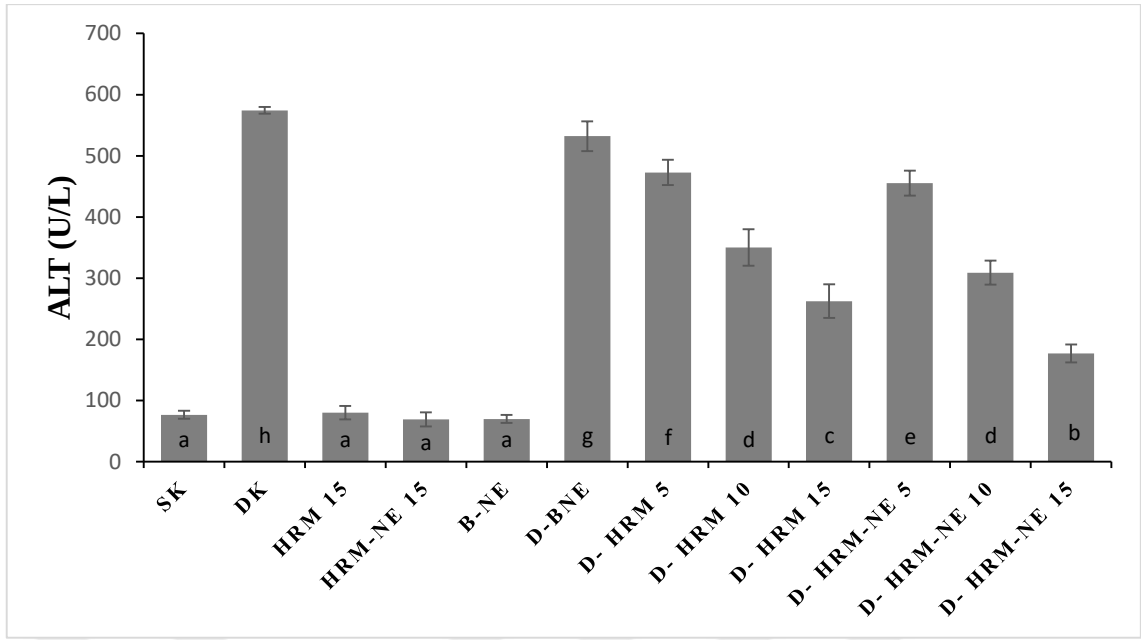
Şekil 4.12. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların AST seviyeleri

Sonuçlarda, aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı kabul edildi ($p>0.05$). Farklı harflerle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edildi ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı. SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM’ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM’ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM’ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

SK grubu DK grubu ile karşılaştırıldığında bu gruplar arasında AST seviyeleri farkının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). DK grubu D-BNE grubu ile karşılaştırıldığında grupların AST seviyelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). SK grubu ile HRM 15, HRM-NE 15 ve B-NE kontrol grupları ile karşılaştırıldığında AST seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). DK grubu ile D-HRM ve D-HRM- NE’nin uygulandığı bütün gruplar karşılaştırıldığında, D-HRM ve D-HRM-

NE'nin uygulandığı bütün grupların AST seviyelerinin DK grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Aynı doz uygulanan D-HRM 5 ve D-HRM-NE 5 grupları arasındaki AST değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür ($p>0.05$). Aynı doz içeren D-HRM 10 ile D-HRM 15 grupları ile D-HRM-NE 10 ile D-HRM-NE 15 grupları arasındaki AST seviyeleri karşılaştırıldığında NE uygulanan grupların AST seviyeleri daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). SK grubu ile karşılaştırıldığında D-HRM 15 ve D-HRM-NE 15 gruplarının AST seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı değerlendirilmiştir ($p>0.05$) ancak SK grubu ile D-HRM ve D-HRM-NE diğer dozları (5 mg/kg, 10 mg/kg) karşılaştırıldığında AST seviyelerinin aralarındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.7, Şekil 4.12).

Kontrol grupları ile; HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanması ile tedavi edilen grupların 21. gün sonunda alınan kan serum numunelerinde ALT düzeyleri Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların ALT düzeyleri

Sonuçlarda, aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı kabul edildi ($p>0.05$). Farklı harflerle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edildi ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı. SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

SK grubu ile DK grubu karşılaştırıldığında gruplar arasındaki ALT seviyeleri farkının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). DK ile D-BNE gruplarının ALT seviyeleri birbirine yakın olsada aralarındaki farkın istatistiksel anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). DK grubu ile D-HRM ve D-HRM-NE'nin uygulandığı bütün gruplar karşılaştırıldığında, D-HRM ve D-HRM-NE gruplarının ALT seviyelerinin DK grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). SK grubu ile HRM 15, HRM-NE 15 ve B-NE kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ALT seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). Aynı doz içeren D-HRM 5, D-HRM 10, D-HRM 15 ile D-HRM-NE 5, D-HRM-NE 10, D-HRM-NE 15 grupları arasındaki ALT seviyeleri karşılaştırıldığında NE

uygulanen grupların ALT seviyelerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). SK grubu ile karşılaştırıldığında D-HRM ve D-HRM-NE gruplarının tamamının ALT seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). (Tablo 4.7, Şekil 4.13)

4.4.4. SOD Aktiviteleri, GSH ve MDA Seviyeleri

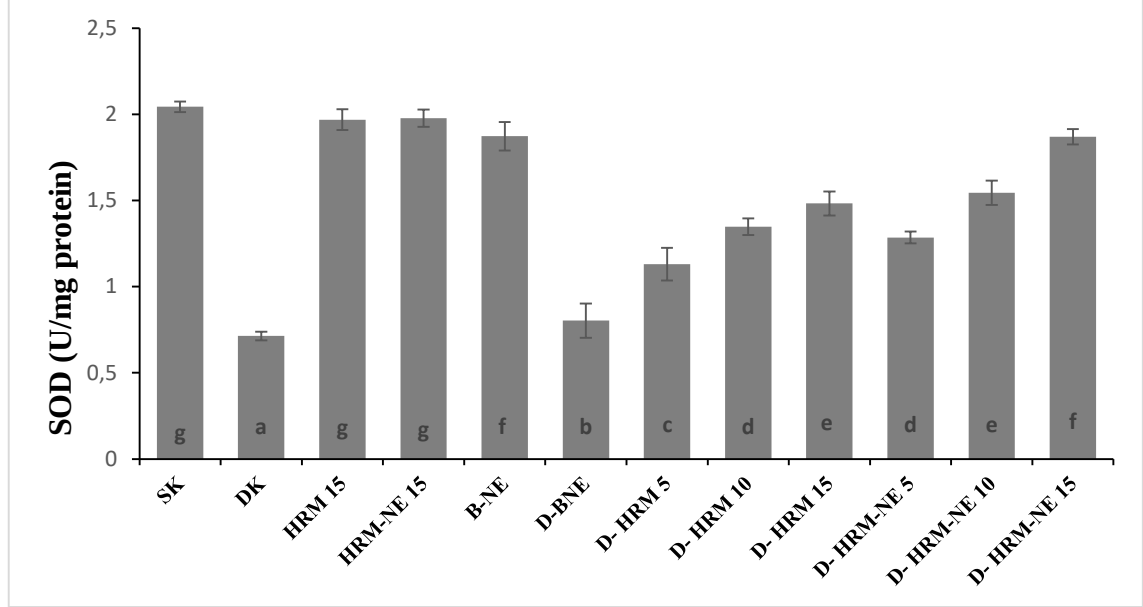
Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanması sonucu tedavi edilen grupların 21. gün sonunda karaciğer dokusundaki SOD aktiviteleri, GSH ve MDA seviyeleri Tablo 4.8 'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların SOD aktiviteleri, GSH ve MDA seviyeleri

Gruplar	SOD (U/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	MDA (nmol /mg protein)
SK	2.04 ± 0.03^g	28.58 ± 2.05^g	$4.32 \pm 0.78^{a,b}$
DK	0.71 ± 0.03^a	7.24 ± 0.26^a	9.28 ± 0.34^f
HRM 15	1.97 ± 0.06^g	25.77 ± 2.78^f	4.42 ± 0.78^b
HRM-NE 15	1.98 ± 0.05^g	26.57 ± 2.20^f	$4.17 \pm 0.34^{a,b}$
B-NE	1.87 ± 0.08^f	23.72 ± 1.90^e	4.50 ± 0.52^b
D-BNE	0.80 ± 0.10^b	8.14 ± 0.56^a	9.10 ± 0.67^f
D-HRM 5	1.13 ± 0.10^c	9.98 ± 0.72^b	7.50 ± 0.55^e
D-HRM 10	1.35 ± 0.05^d	10.96 ± 0.52^b	$6.95 \pm 0.36^{d,e}$
D-HRM 15	1.48 ± 0.07^e	13.82 ± 0.96^c	6.48 ± 0.40^d
D-HRM-NE 5	1.29 ± 0.03^d	11.15 ± 0.85^b	6.84 ± 0.52^d
D-HRM-NE 10	1.54 ± 0.07^e	14.30 ± 0.81^c	5.39 ± 0.49^c
D-HRM-NE 15	1.87 ± 0.04^f	20.17 ± 1.17^d	3.71 ± 0.42^a

Sonuçlarda, aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı kabul edildi ($p>0.05$). Farklı harflerle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edildi ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı. SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı

siçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik siçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik siçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik siçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik siçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik siçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik siçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik siçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

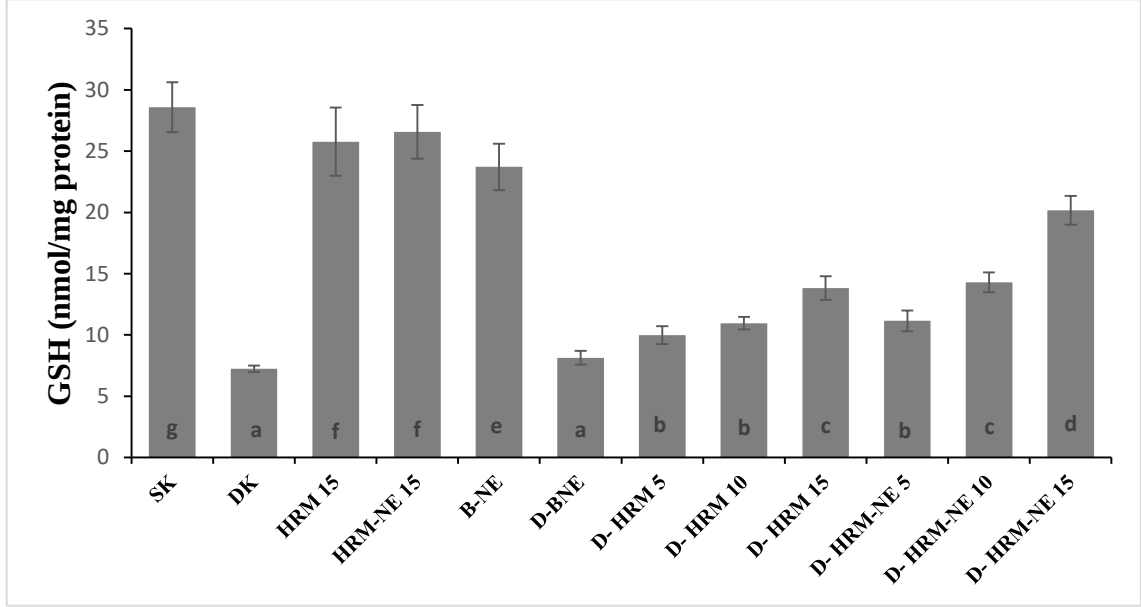


Şekil 4.14. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların SOD aktiviteleri

Sonuçlarda, aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı kabul edildi ($p>0.05$). Farklı harflerle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edildi ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı. SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı siçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı siçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik siçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik siçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik siçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik siçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik siçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik siçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik siçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

SK grubu, DK grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki SOD aktiviteleri farkının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). SK grubu ile HRM 15 ve HRM-NE 15 kontrol grupları karşılaştırıldığında bu grupların SOD aktivitelerinin birbirine yakın olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). D-HRM ve D-HRM-NE'nin uygulandığı bütün grupların SOD aktiviteleri DK grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). D-BNE uygulanan gruba göre D-HRM ve D-HRM-NE 'nin tüm dozlarının uygulandığı gruplardaki SOD aktiviteleri arasındaki

farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). D-HRM 10 ile D-HRM-NE 5 ve D-HRM 15 ile D-HRM-NE 10 grupları karşılaştırıldığında bu grupların SOD aktivitelerinin birbirine yakın olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). SK grubu ile karşılaştırıldığında D-HRM-NE 15 grubunun SOD aktivitesinin SK grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). (Tablo 4.8, Şekil 4.14)

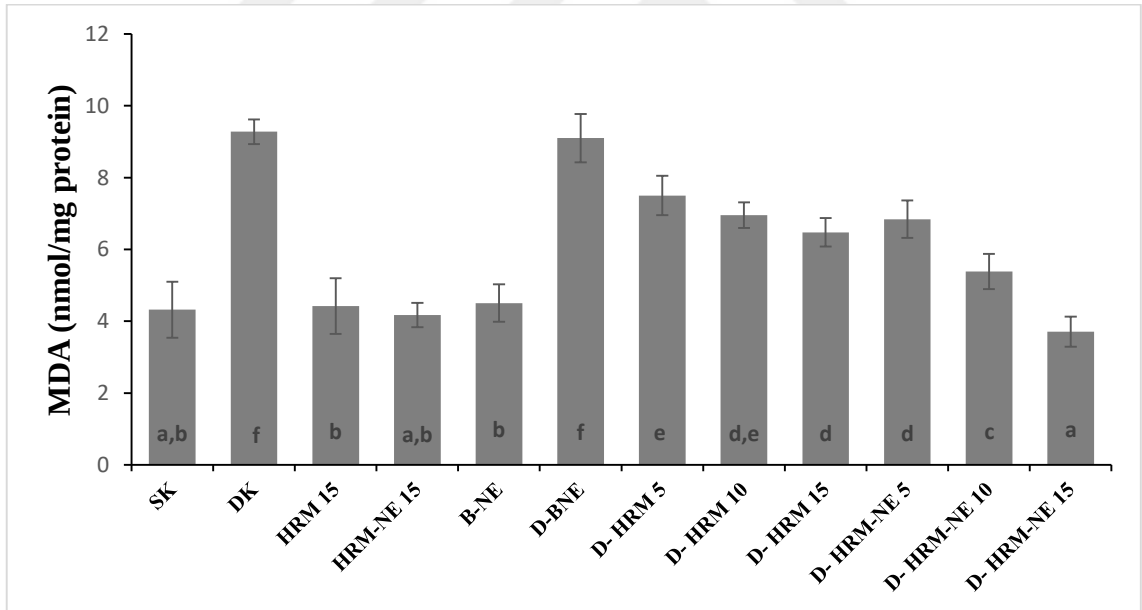


Şekil 4.15. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların GSH düzeyleri

Sonuçlarda, aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı kabul edildi ($p>0.05$). Farklı harflerle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edildi ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı. SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

SK grubu DK grubu ile karşılaştırıldığında grupların GSH seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). DK grubu ile D-BNE grubu karşılaştırıldığında grupların GSH seviyelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). HRM 15 ve HRM-NE 15 kontrol grupları SK grubu karşılaştırıldığında GSH seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). B-NE kontrol grubunun

GSH seviyesi ise SK grubuna göre düşük bulunmuştur ($p<0.05$). DK grubu ile D-HRM ve D-HRM-NE uygulanan tüm gruplar karşılaştırıldığında bu grupların GSH seviyelerinin DK grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). D-BNE uygulanan gruba göre D-HRM ve D-HRM-NE uygulanan tüm gruplar karşılaştırıldığında bu grupların GSH seviyelerinin D-BNE grubuna göre daha yüksek olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). D-HRM-NE 5 grubu ile D-HRM 5 ve D-HRM 10 gruplarının GSH seviyeleri karşılaştırıldığında bu grupların GSH seviyelerinin birbirine yakın olduğu bulunmuştur ($p>0.05$). D-HRM-NE 15 grubu D-HRM ve D-HRM-NE'nin uygulandığı bütün gruplarla karşılaştırıldığında D-HRM-NE 15 grubunun GSH seviyesinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). (Tablo. 4.8, Şekil 4.15)



Şekil 4.16. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulama sonrası grupların MDA düzeyleri

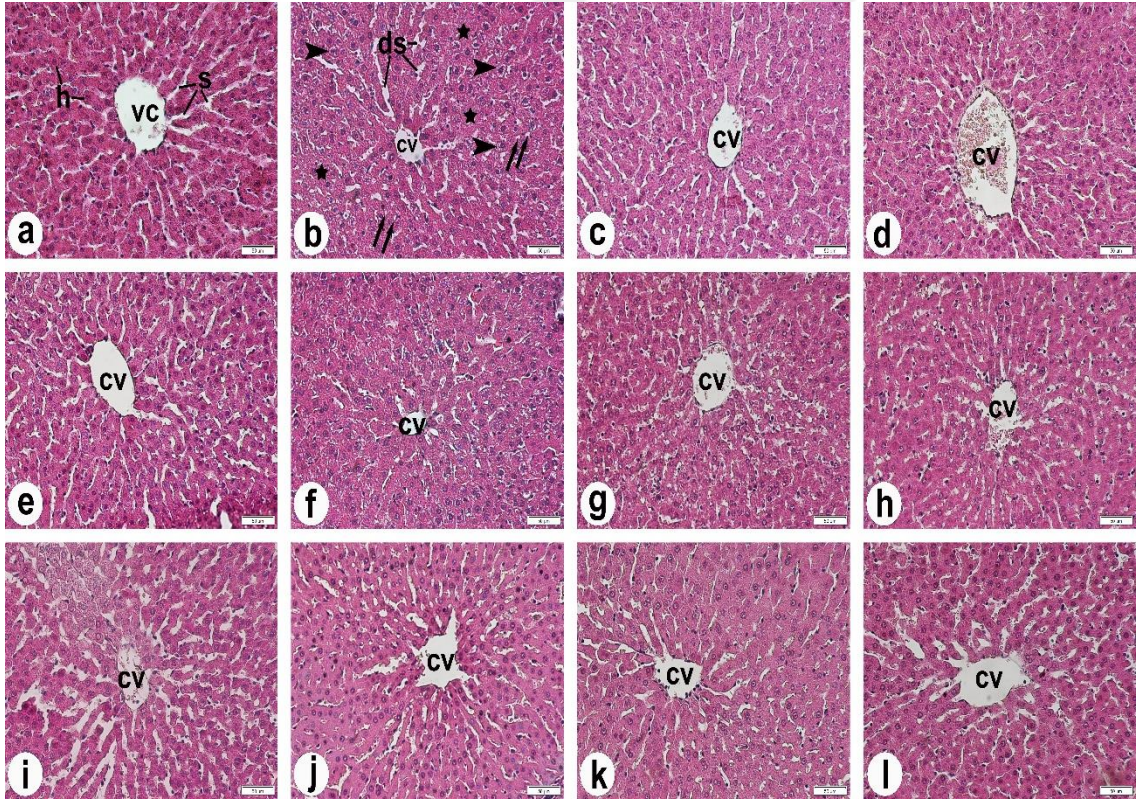
Sonuçlarda, aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı kabul edildi ($p>0.05$). Farklı harflerle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edildi ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı. SK: Sağlıklı kontrol grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, HRM 15: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, HRM-NE 15: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, B-NE: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, D-BNE: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, D-HRM 5: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 10: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, D-HRM 15: Diyabetik sıçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, D- HRM-NE 5: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D- HRM-NE 10: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, D-HRM-NE 15: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

SK grubu ile DK grubu karşılaştırıldığında MDA seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). DK grubu D-BNE grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). SK grubu ile HRM, HRM-NE ve B-NE kontrol grupları karşılaştırıldığında bu grupların MDA seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve istatistiksel açıdan aralarındaki farkın anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). D-HRM 5 ve D-HRM 10 gruplarının MDA seviyelerinin aralarındaki farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Aynı şekilde D-HRM 10, D-HRM 15 ve D-HRM-NE 5 gruplarının MDA seviyelerinin birbirlerine yakın olduğu değerlendirilmiştir ($p>0.05$). D-HRM-NE 15 grubu ile SK grubu karşılaştırıldığında MDA seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). (Tablo 4.8, Şekil 4.16.)

4.5. Histolojik Bulgular

Sağlıklı kontrol grubuna ait karaciğer kesitlerinin histolojik incelemesinde, hepatositlerin santral ven etrafında ışınsal bir düzende dizildiği gözlemlendi. Hücre sınırları belirgindi ve çekirdekler normal görünümdeydi. Sinüzoidler, hepatosit kordonları arasında düzenli bir şekilde dallanmış bir yapı sergiliyordu (Şekil 4.17.a). Diyabet grubundaki sıçanlara ait karaciğer dokuları incelendiğinde, histolojik yapının neredeyse tamamen bozulduğu gözlemlenmiştir. Sinüzoidal dilatasyon ve konjesyona ilaveten hepatositlerin ışınsal tarzda diziliminin bozulduğu izlenmiştir. Hücrelerin sınırları ayırt edilemiyordu, sitoplazmik şişme ve balonlaşma dejenerasyonu belirgin bir şekilde görülmüştür. Hepatositlerde yoğun bir dejenerasyon ve yer yer nekroz alanları belirgin bir şekilde mevcuttu. Ayrıca hepatositlerde mikroveziküler tarzda lipid damlacıkları vardı (Şekil 4.17.b). Diyabetik olmayan HRM 15, HRM- NE 15 ve B-NE kontrol gruplarında histolojik görünüm sağlıklı kontrol grubuna benzer şekilde normal bir görünüm sergilemiştir (Şekil 4.17.c,d ve e). D-BNE grubunun karaciğer kesitlerinde diyabetik

hasar bulguları belirgin bir şekilde mevcuttu (Şekil 4.17.f). D-HRM 5 grubunun karaciğer hasarının histolojik görüntüsü diyabet grubundakine benzer bir görünüm sergilemiştir (Şekil 4.17.g). D-HRM 10 ve D-HRM 15 gruplarında dejenere hücrelerde ve lipid damlacıklarında azalma vardı ve özellikle yüksek doz grubunda sinüzoidler normal görünümdeydi (Şekil 4.17.h ve i). D-HRM-NE 5, D-HRM-NE 10 ve D-HRM-NE 15 gruplarında karaciğerin histolojik görünümünde belirgin bir düzelmenin olduğu dikkat çekiyordu. Karaciğer morfolojisindeki bu düzelme artan dozlarla ilişkili bir şekilde yüksek doz harmin verilen grupta en belirgindi (Şekil 4.17. j, k ve l).



Şekil 4.17. Kontrol grupları, HRM ve HRM içeren NE formülasyonlarının oral uygulanması gruplara ait karaciğer kesitlerinin histolojik görüntüleri

cv: Santral ven; h: Hepatosit; s: Sinüzoid; ds: dilate sinüzoid; ok: Lipid damlacıkları; ds: dilate sinüzoid; *: Nekrotik görünümlü alanlar; ok başı: balonlaşma dejenerasyonu; Boya: Hematoksilin-Eozin. Barlar: 50 µm. a: Sağlıklı kontrol grubu, b: Diyabetik kontrol grubu, c: Sağlıklı sıçan grubu + HRM yüksek doz (15 mg/kg) kontrol grubu, d: HRM yüksek doz (15 mg/kg) içeren NE formülasyonu uygulanan sağlıklı kontrol grup, e: Sağlıklı sıçan grubu+Boş nanoemülsiyon, f: Diyabetik sıçan grubu+ Boş nanoemülsiyon, g: Diyabetik sıçan grubu + 5 mg/kg HRM uygulanan grup, h: Diyabetik sıçan grubu + 10 mg/kg HRM uygulanan grup, i: Diyabetik sıçan grubu +15 mg/kg HRM uygulanan grup, j: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (5 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, k: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (10 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup, l: Diyabetik sıçan grubu + HRM içeren NE (15 mg/kg HRM'ye eşdeğer) formülasyonu uygulanan grup.

5. TARTIŞMA

Besinlerden alınan glukozu enerji üretimi için kan dolaşımından alarak hücrelere geçişini sağlayan temel hormon insülin dir. İnsülin hormonunun eksikliği veya etkin şekilde kullanılmaması sonucu kanda glukoz seviyesi artar ve DM gözlemlenir. Kan şekeri seviyesinin sürekli yüksek olması ise vücutta birçok organının zarar görmesine, nöropati, kardiyovasküler hastalıklar, nefropati gibi kalıcı hasarlara neden olmaktadır (Subramoniam, 2016; Yki-Järvinen, 1992). DM'nin sık görülmesi ve kesin bir tedavisinin olmayışı bu hastalığı önemli bir araştırma konusu yapmaktadır. DM tedavisinde oluşan yan etkiler nedeniyle hastalar arasında antidiyabetik aktiviteye sahip, doğal ürünlerin kullanımına olan talep giderek artmaktadır (Tohma ve Gulçin, 2010; Visavadiya ve ark., 2009). Çalışmamız kapsamında çözünürlüğü kısıtlı olan HRM'nin emiliminin ve dolayısıyla etkinliğinin artması için NE formülasyonu geliştirilmiş ve bu farklı dozlardaki nanoemülsiyon formülasyonu STZ-NA ile indüklenen diyabetik sıçanlara uygulanarak hipoglisemik, antioksidan etkileri ve histopatolojik değerlendirmesi yapılmıştır. Formülasyonda oleik asit yağ fazı; Span 80, Tween 80, Labrasol ve Pluronic F68 ise yüzey etkin madde olarak kullanılmıştır. Bu çalışma, sıçan diyabet modelinde HRM-NE içeren NE formülasyonlarının antioksidan ve hipoglisemik etkilerini ele alan ilk çalışmadır.

İlaç taşıyıcı sistemler ilaç dozu ve dozlama sıklığının azaltılarak yan etkilerin azaltması veya ortadan kaldırılması, etkin maddelerin salım hızının ve salım yerinin kontrol edilmesi ve etkili bir tedavi sağlanması amacıyla geliştirilmektedir. Konvansiyonel dozaj formlarında ilacın plazma düzeyini etkili alanda tutabilmek amacıyla belirli aralıklarla tekrar eden dozlarda verilmesi gerekmektedir. Bunun sonucunda ise ilaç plazma konsantrasyonunun toksik alana çıkmasına veya ilacın etkisiz alana düşmesine sebep olabilmektedir. Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde ise etkin madde

plazma düzeyinin belirli bir süre terapötik aralıkta kalmasını sağlayarak dozlama sıklığı azaltılabilmektedir. Bu sayede geleneksel ilaçlara göre daha düşük bir doz ile tedavi sağlanabilmekte, ilaç yan etkileri minimize edilmektedir. Ayrıca hastaların yaşam kalitesinde artırılmaktadır (Bhagwat ve Vaidhya, 2013; Gürsoy, 2002; Tüylek, 2017). NE formülasyonları, nano-boyutlu damlacıkların sağladığı geniş yüzey alanı ve yapısındaki yüzey etkin maddeler ile emilimin ve oral biyoyararlanımın artmasını sağlayabilmektedir (Gürsoy, 2014; Shaikh ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada, *Andrographis paniculata* bitkisinden elde edilen, antiinflamatuar, antikanser ve antioksidan özellik gösteren ve çözünürlüğü düşük olan “Andrographolide”in biyoyararlanımının artırılması için NE formülasyonları geliştirilmiş ve yapılan farmakokinetik çalışmada süspansiyon formülasyonu ile karşılaştırıldığında biyoyararlanımda yaklaşık olarak 6 kat bir iyileşme tespit edilmiştir (Yen ve ark., 2018). Yine yapılan farklı çalışmalarda da NE formülasyonlarının biyoyararlanımda artış sağlaması açısından faydalı oldukları tespit edilmiştir (Akhtar ve ark., 2014, 2016; Nanjwade ve ark., 2013).

NE formülasyonların karakterizasyonunda damlacık boyutu ve PDI oldukça önemli olup fiziksel stabiliteyi ve biyoyararlanımı etkileyen parametrelerden biridir (Keservani ve Sharma, 2018; Gajendiran ve Abraham, 2019; Zeng ve ark., 2019). Hazırlanan NE formülasyonlarının ortalama damlacık boyutu ve PDI değeri ölçülmüş ve sırasıyla B-NE için 187.09 ± 3.74 nm ve 0.23 ± 0.02 ; HRM-NE için ise 194.07 ± 5.78 nm ve 0.27 ± 0.03 olarak bulunmuştur (Tablo 4.3.). NE formülasyonuna HRM ilavesi ile hem damlacık boyutunda hem de PDI değerlerinde istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). PDI değeri damlacık boyutu dağılımının tekdüzeliğini ifade etmektedir (Danaei ve ark., 2018). B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının PDI değerlerinin 0.3’ten küçük olması, damlacık boyutu dağılımının

dar bir aralıkta olduğunu ve homojenliğinin iyi olduğunu göstermektedir (Kaplan ve ark., 2019).

Zeta potansiyel, kolloidal dağılımların elektrokinetik potansiyeli olup stabilitenin değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Benzer yüklü damlacıkların birbirini itme derecesinin bir göstergesidir. Genel olarak 30 mV üzerindeki mutlak zeta potansiyel değerlerinin emülsiyonlar için iyi bir stabilite sağladığı bilinmektedir (Mahfoudhi ve ark., 2016). Çalışmamızda B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının mutlak zeta potansiyel değerleri sırasıyla -32.93 ± 2.89 ve -38.67 ± 2.92 mV olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3.).

B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının morfolojik analizleri TEM ile yapılmıştır. Analiz sonucunda damlacıkların yaklaşık küresel ve nano-boyutlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.).

B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının FT-IR spekturumları incelendiğinde HRM'ye ait karakteristik piklerin görülmediği, B-NE ve HRM-NE formülasyonlarının FT-IR spekturumlarının benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.8.). Bu durum HRM'nin formülasyonda moleküler düzeyde dağıldığını ve HRM ile diğer formülasyon bileşenleri arasında kimyasal bir etkileşim olmadığını göstermektedir (Kaplan ve ark., 2019).

Çalışmamız iki farklı salım ortamında [pH 1.2 HCl veya pH 6.8 fosfat tamponu (PB)] gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda pH 1.2 HCl'de %98.58, pH 6.8 PB'de ise %89.51 HRM salımı olduğu belirlenmiştir. Asidik pH'da HRM'nin çözünürlüğünün artmasına bağlı olarak daha hızlı bir salım edilmiştir (Şekil 4.9). Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (Bei ve ark., 2013; Chen ve ark., 2016; Mortazavi ve ark., 2021).

DM, yaşam süresinin azalmasına ve neredeyse yetişkin ölümlerinin % 75 oranında artmasına sebep olan bir hastalıktır (Gregg ve ark., 2018; Oh ve ark., 2023; Rhee, 2023). β -hücrelerinde hasar oluşturarak diyabetin ortaya çıkmasına neden olan STZ,

“*Streptomyces achromogenes*”den elde edilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Aughsteen, 2000). STZ uygulandıktan sonra pankreas dokusunda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşabileceği bunun sonucunda da diyabet olduğu sitozolik hem de mitokondriyal fraksiyonda gösterilmiştir (Baştar ve ark., 1998; Jang ve ark., 2000; Zeng ve ark., 2009).

Yapılan bir çalışmada, erkek Sprague-Dawley ratlara bir gecelik açlıktan sonra Nikotinamid 110 mg/kg intraperitoneal enjeksiyon yapıldıktan 15 dakika sonra sitrat tamponu içinde 60 mg/kg doz STZ kullanılarak sıçanlarda diyabet modeli oluşturulmuştur (Chen ve ark., 2013).

Yapılan başka bir çalışmada, Albino Wistar ratlar bir gece aç bırakıldıktan sonra 110 mg/kg NA intraperitoneal olarak uygulandıktan sonra sitrat tamponunda 60 mg/kg STZ uygulanarak sıçanlarda diyabet modeli oluşturulmuştur (Ahmed ve ark., 2017).

Çalışmamızda, literatürde daha önce yayınlanmış olan diyabet modeli geliştirme yöntemleri (Ghasemi ve ark., 2014; Sayeli ve Shenoy, 2021; Szkudelski, 2012) modifiye edilip kullanılarak diyabet modeli oluşturulmuştur. STZ uygulamasından önce 12 saat aç bırakılarak yalnızca içme suyu verilen sıçanlara ilk olarak uygulama öncesi hazırlanan 110 mg/kg NA intraperitoneal olarak ratlara uygulanmıştır. Bu uygulamadan 15 dk sonra yine taze hazırlanmış sitrat tamponu içinde 60 mg/kg STZ çözeltisi intraperitoneal olarak uygulanmıştır. STZ uygulamasından 72 saat sonra tokluk kan glukoz düzeyleri 200 mg/dL ve üzerinde olanlar diyabetli kabul edilerek gruplara ayrılmıştır.

Tarih öncesi çağlardan günümüze kadar insanlar hastalıkların tedavisinde binlerce çeşit bitki türünü kullanmışlardır. Modern tıbbın sağlık üzerindeki etkilerini göz önünde bulundurarak bitkisel ilaçları tek başına ya da diğer ürünlerle birlikte kullanmışlardır (Qadir ve Raja, 2021). Günümüzde bitkisel tedavi arayan hastaların sayısı katlanarak artmaktadır. Bitkisel ilaçlar gelişmekte olan dünyada temel sağlık hizmetleri için büyük

talep görmektedir (Pal ve Shukla, 2003). Bu sebeplerden dolayı bizde antioksidan aktiviteye sahip üzerlik otunun ana etken maddelerinden olan HRM'nin diyabet üzerine etkilerini araştırdık.

Yapılan bir çalışmada diyabetik farelerde HRM'nin etkileri araştırılmış ve HRM verilen gruplarda diyabetik gruba göre karaciğer, pankreas ve böbrek dokularında oluşan hasarların düzeldiğini belirlemişlerdir. Elde edilen bulgular sonucunda HRM kullanılarak tedavi edilen farelerin daha düşük oksidatif strese, daha yüksek antioksidan kapasiteye ve daha düşük lipid profiline sahip olduklarını öne sürmüşlerdir (Morsy ve ark., 2023).

DM bilinen semptomlarının yanında bilişsel işlev bozuklukları içinde ciddi bir risk oluşturmaktadır. Liu ve ark. harminin diyabet kaynaklı bilişsel işlev bozukluğu üzerinde bir etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Yapmış oldukları bu çalışmada STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda HRM'nin NLRP3 inflamazon aktivasyonunu engelleyerek oluşan bilişsel bozuklukları hafiflettiğini tespit etmişlerdir (Liu ve ark., 2020).

Yapılan farklı bir çalışmada STZ (60 mg/kg) ile indüklenen diyabetik sıçanlara HRM 2 hafta boyunca intraperitoneal olarak tek doz (10 mg/kg) uygulanmış ve HRM'nin hiperglisemi ve oksidatif stres gibi nedenlerle oluşan diyabetik nefropatiyi hafiflettiğini belirlemişlerdir (El Tabaa ve ark., 2024).

Çalışmamızda yaptığımız ön denemeler ve literatürde mevcut olan çalışmalar dikkate alınarak (Fortunato ve ark., 2009) D-HRM ve D-HRM-NE'nin uygulama dozları tespit edilmiş, D-HRM ve D-HRM-NE için 5, 10 ve 15 mg/kg dozlarının uygulanmasına karar verilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda tek seferde yüksek doz STZ uygulaması ile oluşturulan diyabet sonrasında hayvanların vücut ağırlığında azalma gözlemlenmiştir (Dinçer ve ark., 2002; Lateef ve ark., 2005; Maritim ve ark., 2003; Obrosova ve ark., 2003).

Çalışmamızda, sıçanlara STZ (60 mg/kg) tek doz uygulanmasından sonra 0, 7, 14 ve 21. günlerde vücut ağırlıkları belirlenmiş, diyabet kontrol gruplarının vücut ağırlıklarında azalma meydana geldiği, D-HRM-NE (5, 10 ve 15 mg/kg) gruplarının ise vücut ağırlıklarında 21. günde çok fazla bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

ALT ve AST başta karaciğer olmak üzere kırmızı kan hücreleri, kalp hücreleri, pankreas, böbrekler ve kas dokusunda bulunan enzimlerdir. Bu enzimler öncelikli olarak karaciğer hastalıklarının teşhisi, kalp ve vücut dokularının hasar alıp almadığının belirlenmesinde yardımcı olmaktadır (Huang ve ark., 2006).

Noroozi Karimabad ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada serum karaciğer enzimleri olan AST, ALT, ALP ve GGT ile diyabet arasındaki ilişkiyi değerlendirmişler ve diyabetli hastalarda serum karaciğer enzimlerinin diyabet olmayan hastalara göre anlamlı bir derecede yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (Noroozi Karimabad ve ark., 2022).

Yapılan başka bir çalışmada STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda kafeik asit fenetil esterinin etkileri biyokimyasal bazı parametreler, oksidatif stres ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda diyabet grubunun AST ve ALT seviyelerinin yükseldiği, tedavi edilen gruplarda ise bu seviyelerin azaldığı tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2015).

Eidi ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada STZ ile indüklenerek diyabet oluşturulan sıçanların 14 gün boyunca bazı parametrelerle beraber AST ve ALT seviyeleri incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda diyabetli sıçanlarda AST ve ALT seviyelerinin önemli derecede yükseldiği belirlenmiştir (Eidi ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalara paralel olarak çalışmamızda AST ve ALT seviyelerinin diyabetli gruplarda arttığı ancak D-HRM ve D-HRM-NE uygulaması sonucunda AST ve ALT seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. DK grubu ile D-HRM ve D-HRM-NE

grupları karşılaştırıldığında AST ve ALT seviyelerinin D-HRM ve D-HRM-NE gruplarında daha düşük olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca artan dozlarla ilişkili bir şekilde D-HRM-NE 15 verilen grupta AST ve ALT seviyelerinin düşüşünün olduğu görülmüştür.

Serbest radikaller (Süperoksit radikalleri, hidroksil radikali vs.) oksidatif fosforilasyon sonucu oluşmakta ve oksidatif hasarlara neden olmaktadır. Serbest radikaller ile antioksidan savunma sisteminin aktivitesi arasında denge çevresel etmenler vb. durumlar sonucunda bozulmakta ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu, DNA mutasyonlarını içine alan oksidatif hasarlar oluşmaktadır (Scandalios, 2005). Oksidatif strese karşı ilk ve öncelikli savunma mekanizmasını SOD oluşturmaktadır (Aksoy, 2008). Antioksidan aktiviteye sahip olan SOD süperoksit radikalinin zararlı etkilerine karşı kollojen dokuyu korur. Bu etki ile lipid peroksidasyonunun inhibe olması sağlanmış olur (Aslan ve ark., 1995). Vücut tarafından oksidatif hasara karşı kullanılan temel savunma mekanizmalarından biri de glutatyondur (Tsai, 1975). Oksidatif strese karşı eritrositlerdeki en etkili ve önemli antioksidan ajandır. Serbest radikal peroksidasyonunun neden olduğu fagositik hücre zararını önlemektedir (Akkus, 1995). Glutasyon peroksidaza bir elektron vererek hidroperoksitlerin azalmasında rol oynayan GSH hücre içi bir antioksidandır. Mitokondriyal GSH oksidatif stresin güvenilir bir parametresi olarak gösterilmektedir. Bu nedenle GSH seviyesinde meydana gelen azalma mitokondriyal fonksiyonun da azaldığını gösterir (Kowluru ve ark., 2006). DM'nin kronik bir durum oluşturması nedeniyle normal durumlarda metabolik substrat ya da yakıt olarak kullanılan glukoz toksik bir madde haline dönüşür. DM nedeniyle oluşan hiperglisemik durumlarda serbest radikallerin düzeylerinin artması ile oksidatif stres artabilir (Yang ve ark., 2011).

Yapılan bir çalışmada, obez gestasyonel diyabetik gebelerde bakır, demir, molibden, selenyum ve çinkonun ile birlikte SOD düzeyinide belirlemişlerdir. Bu çalışma ile obez gestasyonel diyabetik gebelerde SOD düzeyinin düştüğünü tespit etmişlerdir (Al-Saleh ve ark., 2007).

Yapılan başka bir çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlara *Peganum harmala* tohumlarının metanol ekstresi hazırlanarak oral olarak uygulanmış ve 8 hafta sonra sıçanlara ötenazi uygulanarak kan ve doku örnekleri toplanmıştır. Çalışmalar sonucunda diyabetik gruba göre tedavi edilen grupların SOD ve GSH seviyelerinde anlamlı bir şekilde artış, MDA seviyelerinde ise anlamlı düzeyde düşüş olduğunu belirlemişlerdir (Magdy ve ark., 2020).

Bizim çalışmamızda da SK grubunun SOD aktivitesinin DK grubuna göre daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). D-HRM ve D-HRM-NE'nin uygulandığı bütün grupların SOD aktiviteleri DK grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). SK grubu ile karşılaştırıldığında D-HRM-NE 15 grubunun SOD aktivitesinin SK grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Yapılan bir çalışmada, STZ ile indüklenerek diyabet edilen sıçanlarda zeytin yaprağı (*Olea europaea L.*)'nin etanol ekstresinin ve bundan izole edilen oleuropeinin emülsiyon formülasyonlarının etkileri incelenmiştir. Oleuropein ve oleuropein emülsiyonun iki farklı dozunun (150 ve 225 mg/kg) uygulanmasından sonra sıçanların SOD ve GSH düzeylerinde önemli bir artış, MDA düzeylerinde ise azalma olduğu tespit edilmiştir (Aggul ve ark., 2020).

Duysak L. ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada STZ ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda glisirizin içeren NE formülasyonunun hipoglisemik ve antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Glisirizin ve glisirizin içeren NE formülasyonu 3 farklı dozda (10,20 ve 40 mg/kg) uygulanmış ve tedavi edilen grupların MDA seviyelerinin diyabetik gruba göre

azaldığı, SOD ve GSH seviyelerinin ise tedavi edilen grupların diyabetik gruba göre yükseldiğini bildirmişlerdir (Duysak ve ark., 2023).

Çalışmamızda SK grubu DK grubu ile karşılaştırıldığında grupların GSH seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). DK grubu ile D-HRM ve D-HRM-NE uygulanan tüm gruplar karşılaştırıldığında bu grupların GSH seviyelerinin DK grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). D-HRM-NE 15 grubu D-HRM ve D-HRM-NE'nin uygulandığı bütün gruplarla karşılaştırıldığında D-HRM-NE 15 grubunun GSH seviyesinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

MDA lipid peroksidasyonunun yan ürünü olup, çeşitli hastalıklar sonucunda ortaya çıkmakta ve oksidatif hasarın bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Diyabetle birlikte lipid peroksidasyonunun arttığı bilinmekle beraber bunun sebebinin diyabet ile birlikte serbest radikallerin seviyelerinin artması sonucunda olduğu düşünülmektedir. MDA diyabetli hastalarda oksidan/antioksidan dengesini belirlemek için kullanılan önemli bir belirteçtir. Lipid peroksidasyonunda kararsız olan peroksitler MDA gibi aldehitlere ayrışır. MDA yapısında en az iki çift bağ bulunduran araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan toksik bir maddedir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA olduğundan MDA ölçümü ile lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Yapılan çalışmalar neticesinde, hiperglisemi durumunda oksidatif hasardaki artış sonucunda lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir (Berryman ve ark., 2005; Kannan ve Jain, 2000; Zhang ve ark., 2008).

Jalili ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada HRM'nin metotreksat kaynaklı nefrotoksisiteye karşı terapötik etkileri fareler üzerinde incelenmiştir. Fareler 6 gruba

ayrılmış ve metotreksat 20 mg/kg, HRM ise 3 farklı dozda (5, 10 ve 20 mg/kg) intraperitonel olarak 14 gün uygulanmıştır. Uygulama sonucunda HRM verilen kontrol gruplarının SOD seviyesinin metotreksat verilen gruba göre daha yüksek, MDA seviyesinin ise HRM uygulanan kontrol gruplarında metotreksat uygulanan gruba göre daha düşük düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir (Jalili ve ark., 2021).

Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda diyabet hastalığı öncesinde ve sonrasında oksidan-antioksidan durumlar karşılaştırılmış ve MDA seviyelerinin diyabetli grupta yüksek olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$) (Akkaya ve Çelik, 2010).

Yapılan başka bir çalışmada STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda *Peganum harmala* tohumlarının hidroalkolik ekstraktının antidiyabetik ve antihiperlipidemik etkileri incelenmiştir. Ratlar 8 gruba ayrılmış olup ekstrakt diyabetik sıçanlara 4 hafta boyunca oral yoldan uygulanmıştır. Tedavi sonrası diyabetik sıçanlara göre tedavi gruplarının glukoz, lipid profilleri, AST, ALT ve MDA seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. Bütün ekstrakt gruplarında MDA seviyesinde ki düşüşün ise anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir ($p<0.01$) (Komeili ve ark., 2016).

Bizim çalışmamızda da, SK grubu ile DK grubu karşılaştırıldığında MDA seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). D-HRM 10, D-HRM 15 ve D-HRM-NE 5 gruplarının MDA seviyelerinin birbirlerine yakın olduğu değerlendirilmiştir ($p>0.05$). D-HRM-NE 15 grubu ile SK grubu karşılaştırıldığında ise MDA seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Yapılan bir çalışmada diyabetik farelerde HRM uygulaması sonucunda diyabetik gruba göre kontrol gruplarında böbrek ve pankreas yapısında ki patolojik hasar insidansının azaldığı, karaciğerin histolojik kesitlerinde ortaya çıkan hücrel nekroz ve hasarlı hepositlerin etkili bir şekilde düzeldiği tespit edilmiştir (Morsy ve ark., 2023).

Bizim alışmamızda da histopatolojik değerdendirmeler sonucunda D-HRM 10 ve D-HRM 15 gruplarında dejenere hücrelerde ve lipid damlacıklarında azalma tespit edilmiştir ve özellikle yüksek doz grubunda sinüzoidlerin normal görünümde olduğu belirlenmiştir. HRM içeren NE (D-HRM-NE 5, D-HRM-NE 10 ve D-HRM-NE 15) gruplarında karaciğerin histolojik görünümünde belirgin bir düzelmenin olduğu ve karaciğer morfolojisindeki bu düzelmenin artan dozlarla ilişkili bir şekilde D-HRM-NE 15 verilen grupta en fazla olduğu tespit edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Bu çalışma ile; HRM içeren NE formülasyonu başarılı bir şekilde hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- ✓ HRM'nin miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirilerek analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.
- ✓ NE formülasyonları başarılı bir şekilde hazırlanmış ve *in vitro* karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.
- ✓ Farklı dozlarda hazırlanan HRM-NE formülasyonlarının *in vivo* etkinliği incelenmiş ve HRM uygulanan gruplara göre HRM-NE uygulanan grupların kan şekeri seviyelerinin daha düşük olduğu saptanmıştır.
- ✓ Bu çalışma ile; HRM ve HRM içeren NE uygulamaları, diyabetik sıçanlarda belirgin bir antioksidan etki göstermiştir. Özellikle HRM-NE formülasyonları GSH seviyelerinde ve SOD aktivitelerinde önemli bir artış sağlarken MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.
- ✓ Tedavi edilen diyabetik sıçanların karaciğer fonksiyonlarına dair ölçülen AST ve ALT seviyelerinde belirgin bir iyileşme kaydedilmiştir. HRM-NE uygulanan gruplarda bu iyileşmenin doza bağlı olarak daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.
- ✓ Histopatolojik analizler, HRM ve HRM-NE tedavilerinin diyabetik sıçanların karaciğer morfolojisini iyileştirdiğini ve sağlıklı gruba benzer bir yapıya dönüştürdüğünü ortaya koymuştur. Bu iyileşme HRM-NE gruplarında daha belirgin olmuştur.
- ✓ Bu çalışmanın bulguları, HRM-NE formülasyonlarının diyabet tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceğini göstermektedir. Klinik çalışmalar yapılarak HRM-NE'nin insanlar üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.

- ✓ HRM ve HRM-NE'nin uzun vadeli etkileri ve güvenilirliği araştırılmalıdır. Bu çalışmalar, hem diyabetin kronik doğası hem de tedavinin uzun süreli kullanımı için önemlidir.
- ✓ HRM-NE optimal doz aralığını belirlemek için daha fazla çalışma yapılmalıdır. Ayrıca çalışmada kullanılan en yüksek doz olan 15 mg/kg üzerindeki dozlarla etkinlik ve toksisite çalışmaları ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır. Bu, hem etkili tedavi sunmak hem de olası yan etkileri minimize etmek için gereklidir.
- ✓ Sonuç olarak, ilaç taşıyıcı sistem şeklinde hazırlanan HRM-NE formülasyonlarının diyabet üzerine olumlu etkiler oluşturduğu ve diyabetik sıçanların karaciğer dokularında oluşan hasarın azaltılmasında etkili olabileceği belirlenmiştir. İlaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanan NE formülasyonlarının saf HRM'nin oral biyoyararlanımını artırmak için faydalı olabileceği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile elde edilen verilerin literatüre ve sonraki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abolmaali, S. S., Tamaddon, A. M., Farvadi, F. S., Daneshamuz, S., & Moghimi, H. (2011). *Pharmaceutical nanoemulsions and their potential topical and transdermal applications*.
- Abraham, J. (2010). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. In *Handbook of transnational economic governance regimes* (pp. 1041–1053). Brill Nijhoff.
- Agency, E. M. (1995). ICH Topic Q 2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. *Prescrire Int*, 20, 278.
- Aggul, A. G., Gulaboglu, M., Cetin, M., Ozakar, E., Ozakar, R. S., & Aydin, T. (2020). Effects of emulsion formulations of oleuropein isolated from ethanol extract of olive leaf in diabetic rats. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 92.
- Ahmed, D., Khan, M. I., Kaithwas, G., Roy, S., Gautam, S., Singh, M., Devi, U., Yadav, R., Rawat, J., & Saraf, S. (2017). Molecular docking Analysis and Antidiabetic activity of Rifabutin against STZ-NA induced diabetes in albino wistar rats. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(3), 269–284.
- Akhtar, J., Hussain Siddiqui, H., Fareed, S., & Aqil, M. (2014). Nanomulsion as a carrier for efficient delivery of metformin. *Current Drug Delivery*, 11(2), 243–252.
- Akhtar, J., Siddiqui, H. H., Fareed, S., Badruddeen, Khalid, M., & Aqil, M. (2016). Nanoemulsion: for improved oral delivery of repaglinide. *Drug Delivery*, 23(6), 2026–2034.

- Akkaya, H., & Çelik, S. (2010). Ratlarda diyabet öncesi ve sonrası oksidan-antioksidan durum. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Derg*, 24(1), 5–10.
- Akkus, I. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1-151. *Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım AS Konya*.
- Aksoy, M. (2008). *Beslenme biyokimyası*. Hatiboğlu Yayınları.
- Aksoy, Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 442–448.
- Al-Saleh, E., Nandakumaran, M., Al-Rashdan, I., Al-Harmi, J., & Al-Shammari, M. (2007). Maternal-foetal status of copper, iron, molybdenum, selenium and zinc in obese gestational diabetic pregnancies. *Acta Diabetologica*, 44, 106–113.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199–212.
- Aslan, R., Şekeroğlu, M. R., & Bayıroğlu, F. (1995). Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2), 137–142.
- Association, A. D. (2013). Standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care*, 36(Suppl 1), S4.
- Aughsteen, A. A. (2000). An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice. *Microscopy*, 49(5), 681–690.
- Avcı A. (2001). *Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi ve E Vitaminin Etkileri Ankara Üni. Tıp Fak.*
- Başbağ, S. (1993). Halk Hekimliğinde kullanılan ve halk ağzından derlemeler sözlüğünde yer alan tıbbi bitkiler. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Adana*.

- Basha, S. P., Rao, K. P., & Vedantham, C. (2013). A brief introduction to methods of preparation, applications and characterization of nanoemulsion drug delivery systems. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(1), 25.
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M., & Doelman, C. J. A. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S2–S13.
- Baştar, I., Seckin, S., Uysal, M., & Aykaç-Toker, G. (1998). Effect of streptozotocin on glutathione and lipid peroxide levels in various tissues of rats. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 102(3), 265–272.
- Bei, Y.-Y., Zhou, X.-F., You, B.-G., Yuan, Z.-Q., Chen, W.-L., Xia, P., Liu, Y., Jin, Y., Hu, X.-J., & Zhu, Q.-L. (2013). Application of the central composite design to optimize the preparation of novel micelles of harmine. *International Journal of Nanomedicine*, 1795–1808.
- Berkli, Y. (2007). Erzurum’da yeni bulunan haç motifli koç heykelinin düşündürdükleri. *Atatürk Üniversitesi Türkiyat Araştırmaları Enstitüsü Dergisi*, 14(34), 215–232.
- Berlin, J., Rügenhagen, C., Greidziak, N., Kuzovkina, I. N., Witte, L., & Wray, V. (1993). Biosynthesis of serotonin and β -carboline alkaloids in hairy root cultures of *Peganum harmala*. *Phytochemistry*, 33(3), 593–597.
- Berrougui, H., Isabelle, M., Cloutier, M., Hmamouchi, M., & Khalil, A. (2006). Protective effects of *Peganum harmala* L. extract, harmine and harmaline against human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(7), 967–974.

- Berryman, A. M., Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins III, J. B. (2005). Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol, β -carotene, and α -lipoic acid on parameters of oxidative stress. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18(6), 345–352.
- Bhagwat, R. R., & Vaidhya, I. S. (2013). Novel drug delivery systems: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(3), 970.
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066–1077.
- Canzian, F., Salovaara, R., Hemminki, A., Kristo, P., Chadwick, R. B., Aaltonen, L. A., & de la Chapelle, A. (1996). Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Research*, 56(14), 3331–3337.
- Carr, A. C., & Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(6), 1086–1107.
- Cayman Chemical Company. (n.d.-a). *Glutathione Assay Kit*. <https://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf>. www.caymanchem.com
- Cayman Chemical Company. (n.d.-b). *Protein Determination Kit*. <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/704002.pdf>. www.caymanchem.com
- Cayman Chemical Company. (n.d.-c). *Superoxide Dismutase Assay Kit*. <https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf>. www.caymanchem.com
- Cayman Chemical Company. (n.d.-d). *TBARS Assay Kit*. <https://www.caymanchem.com/pdfs/10009055.pdf>.

- Cemeli, E., Baumgartner, A., & Anderson, D. (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 51–67.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Chen, T., Kagan, L., & Mager, D. E. (2013). Population pharmacodynamic modeling of exenatide after 2-week treatment in STZ/NA diabetic rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(10), 3844–3851.
- Chen, W., Yuan, Z.-Q., Liu, Y., Yang, S., Zhang, C., Li, J., Zhu, W., Li, F., Zhou, X., & Lin, Y. (2016). Liposomes coated with N-trimethyl chitosan to improve the absorption of harmine in vivo and in vitro. *International Journal of Nanomedicine*, 325–336.
- Chi, K.-K., Zhang, W.-H., Chen, Z., Cui, Y., He, W., Wang, S.-G., Zhang, C., Chen, J., & Wang, G.-C. (2016). Comparison of quercetin and resveratrol in the prevention of injury due to testicular torsion/detorsion in rats. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 908.
- Chime, S. A., Kenekwukwu, F. C., & Attama, A. A. (2014). Nanoemulsions—advances in formulation, characterization and applications in drug delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, 3, 77–126.
- Çıkrıkçıoğlu, M. (2001). Duran E. *Koroner Dolaşım, İskemi ve Reperfüzyon. İnsizyon*, 4(4), 119–122.
- Çınar, K. (2017). A review on nanoemulsions: preparation methods and stability. *Trakya Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*.
- Committee, A. D. A. P. P. (2022). American Diabetes Association Professional Practice Committee. *Draznin, B., Aroda, VR, Bakris, G., Benson, G., et Al*, 2.

- Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J., & Wąsowicz, W. (2015). Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy*, 66(3).
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- Devendra, D., Liu, E., & Eisenbarth, G. S. (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *Bmj*, 328(7442), 750–754.
- DG, G. (2007). Endocrine emergencies: myxedema coma. *Greenspan's Basic Clinical Endocrinology*, 868–870.
- Dinçer, Y., Telci, A., Kayalı, R., Yılmaz, İ. A., Çakatay, U., & Akçay, T. (2002). Effect of α -lipoic acid on lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities in diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(4), 281–284.
- Duysak, L., Kaplan, A. B. U., Gulaboglu, M., Cetin, M., Kutlu, Z., & Demirci, T. (2023). Investigation of the effects of nanoemulsion formulation containing glycyrrhizin in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Bioscience*, 56, 103210.
- Eidi, A., Eidi, M., & Esmaeili, E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 13(9–10), 624–629.
- El Tabaa, M. M., El Tabaa, M. M., Rashad, E., Elballal, M. S., & Elazazy, O. (2024). Harmine alleviated STZ-induced rat diabetic nephropathy: A potential role via regulating AMPK/Nrf2 pathway and deactivating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) signaling. *International Immunopharmacology*, 132, 111954.

- Eser, E. (1995). Diabetes Mellitus ve Topluma Getirdiği Ekonomik Yük. *Ege Üni. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi*.
- Evcimen, M. (2015). *Kadmiyum toksikasyonuna maruz bırakılan ratlarda polydatin ve üzüm çekirdeği ekstraktının kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularına etkilerinin histopatolojik ve oksidan-antioksidan göstergelerle araştırılması*.
- Fantel, A. G. (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology*, 53(3), 196–217.
- Federation, I. D. (2017). IDF diabetes atlas 8th edition. *International Diabetes Federation*, 905–911.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36, 327–358.
- Fortunato, J. J., Réus, G. Z., Kirsch, T. R., Stringari, R. B., Stertz, L., Kapczinski, F., Pinto, J. P., Hallak, J. E., Zuardi, A. W., & Crippa, J. A. (2009). Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(8), 1425–1430.
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412–426.
- Gajendiran, A., & Abraham, J. (2019). *Nanoemulsions for Drug Delivery*. Nanodispersions for Drug Delivery. New Jersey: Apple Academic Press.
- Genuth, S., Alberti, K., Bennett, P., Buse, J., DeFronzo, R., Kahn, R., Kitzmiller, J., Knowler, W. C., Lebovitz, H., & Lernmark, A. (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26(11), 3160–3168.

- Ghasemi, A., Khalifi, S., & Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), 408–420.
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 39(8), 1529–1542.
- Gospin, R., Leu, J. P., & Zonszein, J. (2017). Diagnostic criteria and classification of diabetes. In *Principles of Diabetes Mellitus: Third Edition* (pp. 123–138). Springer International Publishing.
- Gregg, E. W., Cheng, Y. J., Srinivasan, M., Lin, J., Geiss, L. S., Albright, A. L., & Imperatore, G. (2018). Trends in cause-specific mortality among adults with and without diagnosed diabetes in the USA: an epidemiological analysis of linked national survey and vital statistics data. *The Lancet*, 391(10138), 2430–2440.
- Grubu, U. D. K. (2020). *TURKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2019*.
- Guideline, I. H. T. (2003). Stability testing of new drug substances and products. *Q1A (R2), Current Step*, 4(1–24).
- Gürsoy, A. Z. (2002). Kontrollü salım sistemleri. *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları*, 1.
- Gürsoy, A. Z. (2014). *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*. İstanbul, Turkey: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını.
- Gürsoy, Ş. (2008). *Düzenli spor yapan öğrenci gruplarında egzersizin total antioksidan kapasite ve serum lipid profili üzerine etkisi*.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819–1828.
- Halliwell, B. (1984). Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med. Biol.*, 62, 71–77.

- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S14–S22.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 344(8924), 721–724.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet*, 323(8391), 1396–1397.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Production of hydroxyl radicals in living systems. *Free Radicals Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, 31.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hamden, K., Carreau, S., Ayadi, F., Masmoudi, H., & Abdelfattah, E. L. (2009). Inhibitory effect of estrogens, phytoestrogens, and caloric restriction on oxidative stress and hepato-toxicity in aged rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22(5), 381–387.
- Henle, E. S., & Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19095–19098.
- Herraiz, T., González, D., Ancín-Azpilicueta, C., Arán, V. J., & Guillén, H. (2010). β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 839–845.
- Huang, X.-J., Choi, Y.-K., Im, H.-S., Yarimaga, O., Yoon, E., & Kim, H.-S. (2006). Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*, 6(7), 756–782.

IDF Diabetes Atlas, 9th edition . (2019).

İlyasoğlu, H., & El, S. N. (2010). Nanoemülsiyonlar: Oluşumları, yapıları ve kollodial salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *Gıda*, 35(2), 143–150.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas,. (2021).

Jalili, C., Darakhshan, S., Akhshi, N., Abdolmaleki, A., & Abdi, A. (2021). Harmine has nephroprotective effect against methotrexate-induced injury in mice via inhibition of oxidative stress. *Research Journal of Pharmacognosy*, 8(4), 9–19.

Jang, Y. Y., Song, J. H., Shin, Y. K., Han, E. S., & Lee, C. S. (2000). Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*, 42(4), 361–371.

Kahn, S. E., Prigeon, R. L., Schwartz, R. S., Fujimoto, W. Y., Knopp, R. H., Brunzell, J. D., & Porte Jr, D. (2001). Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and islet β -cell function as explanations for metabolic diversity. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 354S-360S.

Kannan, K., & Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3), 153–163.

Kaplan, A. B. U., Cetin, M., Orgul, D., Taghizadehghalehjoughi, A., Hacimuftuoglu, A., & Hekimoglu, S. (2019). Formulation and in vitro evaluation of topical nanoemulsion and nanoemulsion-based gels containing daidzein. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 189–203.

Keservani, R. K., & Sharma, A. K. (2018). *Nanodispersions for drug delivery*. CRC Press.

Kilinc, K., & Kilinc, A. (2002). Oksijenin Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 100–118.

- Kırıcı, S., Kayıran, S. D., & Tokuz, G. (2018). Doğu Akdeniz bölgesinde üzerlik (*Peganum harmala* L.) bitkisinin tütsü olarak kullanımı. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 8(1), 1–12.
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (1984). Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(14), 4343–4347.
- Klein, B. E. K., Klein, R., Moss, S. E., & Cruickshanks, K. J. (1996). Parental history of diabetes in a population-based study. *Diabetes Care*, 19(8), 827–830.
- Komeili, G., Hashemi, M., & Bameri-Niafar, M. (2016). Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic effects of *Peganum harmala* seeds in diabetic rats. *Cholesterol*, 2016.
- Kopáni, M., Celec, P., Danišovič, L., Michalka, P., & Biró, C. (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*, 364(1–2), 61–66.
- Kowluru, R. A., Kowluru, V., Xiong, Y., & Ho, Y.-S. (2006). Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(8), 1191–1196.
- Lateef, H., Aslam, M. N., Stevens, M. J., & Varani, J. (2005). Pretreatment of diabetic rats with lipoic acid improves healing of subsequently-induced abrasion wounds. *Archives of Dermatological Research*, 297, 75–83.
- Liu, P., Li, H., Wang, Y., Su, X., Li, Y., Yan, M., Ma, L., & Che, H. (2020). Harmine ameliorates cognitive impairment by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and enhancing the BDNF/TrkB signaling pathway in STZ-induced diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 535.

- Lovelyn, C., & Attama, A. A. (2011). Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2(05), 626.
- Magdy, N., Salama, M., Alsaedy, Y., & El-Sayed, G. (2020). Ameliorative effects of Pergamum harmala seed extract on obese diabetic rats. *Mansoura Veterinary Medical Journal*, 21(3), 116–120.
- Mahfoudhi, N., Ksouri, R., & Hamdi, S. (2016). Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: Preparation, characterization, and applications in food industry. In *Emulsions* (pp. 365–403). Elsevier.
- Mahmoudian, M., Jalipour, H., & Salehian Dardashti, P. (2002). Toxicity of Peganum harmala: review and a case report. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 1(1), 1.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins Iii, J. B. (2003). Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(5), 288–294.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(21), 5753–5760.
- Mellitus, T. D., & Tanı, K. (2020). Tedavi ve İzlem Kılavuzu, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. *BAYT Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın*.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144–148.

- Moradi, M.-T., Karimi, A., Rafieian-Kopaei, M., & Fotouhi, F. (2017). In vitro antiviral effects of Peganum harmala seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. *Microbial Pathogenesis*, 110, 42–49.
- Morsy, M. H. E., Nabil, Z. I., Darwish, S. T., Al-Eisa, R. A., & Mehana, A. E. (2023). Anti-diabetic and anti-adipogenic effect of harmine in high-fat-diet-induced diabetes in mice. *Life*, 13(8), 1693.
- Mortazavi, N., Heidari, M., Rabiei, Z., Enferadi, S. T., & Monazzah, M. (2021). Loading harmine on nanographene changes the inhibitory effects of free harmine against MCF-7 and fibroblast cells. *Medicinal Chemistry Research*, 30, 1108–1116.
- Mowafy, H. A., Alanazi, F. K., & El Maghraby, G. M. (2012). Development and validation of an HPLC–UV method for the quantification of carbamazepine in rabbit plasma. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(1), 29–34.
- Nanjwade, B. K., Varia, P. J., Kadam, V. T., Srichana, T., & Kamble, M. S. (2013). Development and evaluation of nanoemulsion of Repaglinide. *JSM Nanotechnol Nanomed*, 1(2), 1016.
- Nettleship, L., & Slaytor, M. (1974). Limitations of feeding experiments in studying alkaloid biosynthesis in Peganum harmala callus cultures. *Phytochemistry*, 13(4), 735–742.
- Niazi, S., Tahmasebi Enferadi, S., & Ghaderitabar, H. (2021). Variation of Main Alkaloids and Fatty Acids among Five Natural Populations of Peganum harmala L. from Iran. *Journal of Medicinal Plants and By-Product*, 10(1), 45–52.

- Noroozi Karimabad, M., Khalili, P., Ayoobi, F., Esmaeili-Nadimi, A., La Vecchia, C., & Jamali, Z. (2022). Serum liver enzymes and diabetes from the Rafsanjan cohort study. *BMC Endocrine Disorders*, 22(1), 127.
- Obrosova, I. G., Fathallah, L., Liu, E., & Nourooz-Zadeh, J. (2003). Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL- α -lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 186–195.
- Oh, J., Kim, S., Lee, M., Rhee, S. Y., Kim, M. S., Shin, J.-Y., Lim, H., Lee, S. W., Rahmati, M., & Kim, S. (2023). National and regional trends in the prevalence of type 2 diabetes and associated risk factors among Korean adults, 2009–2021. *Scientific Reports*, 13(1), 16727.
- Organization, W. H. (2006). *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation*.
- Osel, N., Planinšek Parfant, T., Kristl, A., & Roškar, R. (2021). Stability-Indicating Analytical Approach for Stability Evaluation of Lactoferrin. *Pharmaceutics*, 13(7), 1065.
- Özkan, O. (1998). *Tip 2 Diyabetik Mikrovasküler Komplikasyonlarında Glisemik Kontrolün Öngörülen Faydaları*’. Literatür.
- Öztürk, A. S., Aytekin, İ., Özsoy, Ş. Y., Öztürk, O. H., Altuğ, N., & Yılmaz, N. (2015). Effects of caffeic acid phenethyl ester on oxidative stress, histopathology and some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats/Streptozotocin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda oksidatif stres, histopatolojik ve bazı biyokimyasal parametrelere kafeik asit fenetil esterinin etkileri. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(2), 149–156.
- Pal, S. K., & Shukla, Y. (2003). Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 4(4), 281–288.

- Patel, K., Gadewar, M., Tripathi, R., Prasad, S. K., & Patel, D. K. (2012). A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid "Harmine." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 660–664.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
- Pitkänen, O. M., Martin, J. M., Hallman, M., Åkerblom, H. K., Sariola, H., & Andersson, S. M. (1992). Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sciences*, 50(5), 335–339.
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3342.
- Pour, A. B., & Moghadar, N. (2012). Larval effect of extract of harmine and harmalin from *Peganum harmala* on juvenile of *Protostrongylus rufescens*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(5), 63.
- Prashanth, D., & John, S. (1999). Antibacterial activity of *Peganum harmala*. *Fitoterapia*, 70(4), 438–439.
- Qadir, S. U., & Raja, V. (2021). Herbal medicine: Old practice and modern perspectives. In *Phytomedicine* (pp. 149–180). Elsevier.
- Rhee, S. Y. (2023). Obesity: Lessons learned and the way forward. *Life Cycle*, 3.
- Sarker, A., Shimu, I. J., Tuhin, R. H., & Raju, A. A. (2015). Nanoemulsion: An excellent mode for delivery of poorly soluble drug through different routes. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12), 966–976.

- Satman, İ., İmamoğlu, Ş., Yılmaz, C., Akalın, S., Salman, S., & Dinççağ, N. (2019). TEMD Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. *Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu-2019. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED) Yayınları, Bayt Matbaacılık, Ankara.*
- Satman, I., Yılmaz, T., Sengul, A., Salman, S., Salman, F., Uygur, S., Bastar, I., Tütüncü, Y., Sargin, M., & Dinççag, N. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25(9), 1551–1556.
- Sayeli, V. K., & Shenoy, A. K. (2021). Antidiabetic effect of bio-enhanced preparation of turmeric in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic Wistar rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 12(3), 474–479.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995–1014.
- Setya, S., Talegaonkar, S., & Razdan, B. K. (2014). Nanoemulsions: formulation methods and stability aspects. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 3(2), 2214–2228.
- Sezer, K., & Keskin, M. (2014). Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Dergisi*, 28(1), 49–56.
- Shabani, S. H. S., Tehrani, S. S. H., Rabiei, Z., Enferadi, S. T., & Vannozzi, G. P. (2015). Peganum harmala L.'s anti-growth effect on a breast cancer cell line. *Biotechnology Reports*, 8, 138–143.
- Shabir, G. A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug

- Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987(1–2), 57–66.
- Shah, P., Bhalodia, D., & Shelat, P. (2010). Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(1).
- Shaikh, M. S., Derle, N. D., & Bhamber, R. (2012). Permeability enhancement techniques for poorly permeable drugs: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(7), 34–39.
- Sharaf, M., El-Ansari, M. A., Matlin, S. A., & Saleh, N. A. M. (1997). Four flavonoid glycosides from *Peganum harmala*. *Phytochemistry*, 44(3), 533–536.
- Sharma, N., Bansal, M., Visht, S., Sharma, P. K., & Kulkarni, G. T. (2010). Nanoemulsion: A new concept of delivery system. *Chronicles of Young Scientists*, 1(2), 2–6.
- Siddiqui, S., Khan, O. Y., Faizi, S., & Siddiqui, B. S. (1987). Studies on the chemical constituents of the seeds of *Peganum harmala*. Isolation and structure of a new β -carboline alkaloid. Harmalicine. *Heterocycles (Sendai)*, 26(6), 1563–1567.
- Siddiqui, S., Khan, O. Y., Faizi, S., & Siddiqui, B. S. (1989). Studies on the chemical constituents of the seeds of *Peganum harmala*: isolation and structure elucidation of two β -carbolines—harmalacine and norharmine. *Heterocycles (Sendai)*, 29(3), 521–527.
- Sies, H. (2020). Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852.
- Smith, C. M. (2005). *Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach*. Lippincott Williams and Wilkins.

- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3–4), 102–110.
- Stadtman, E. R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9), 1105–1112.
- Subramoniam, A. (2016). *Anti-Diabetes Mellitus Plants*. CRC Press.
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., & Mbanya, J. C. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*, 237(5), 481–490.
- Temple, N. J. (2000). Re: "Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women.". *American Journal of Epidemiology*, 151(6), 634–635.
- Tohma, H. S., & Gulçin, I. (2010). Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *International Journal of Food Properties*, 13(4), 657–671.
- Tsai, A. C. (1975). Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in the liver of cholesterol-fed rats. *The Journal of Nutrition*, 105(7), 946–951.
- Tüylek, Z. (2017). İlaç Taşıyıcı Sistemler Ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89–98.

- Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
- Visavadiya, N. P., Soni, B., & Dalwadi, N. (2009). Evaluation of antioxidant and anti-atherogenic properties of Glycyrrhiza glabra root using in vitro models. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup2), 135–149.
- Wang, H. X., & Ng, T. B. (1999). Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sciences*, 65(25), 2663–2677.
- Wang, P., Alvarez-Perez, J.-C., Felsenfeld, D. P., Liu, H., Sivendran, S., Bender, A., Kumar, A., Sanchez, R., Scott, D. K., & Garcia-Ocaña, A. (2015). A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication. *Nature Medicine*, 21(4), 383–388.
- Wareham, N. J., & O’Rahilly, S. (1998). The changing classification and diagnosis of diabetes: new classification is based on pathogenesis, not insulin dependence. In *BMJ* (Vol. 317, Issue 7155, pp. 359–360). British Medical Journal Publishing Group.
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), R107–R116.
- Xin, X., Zhang, H., Xu, G., Tan, Y., Zhang, J., & Lv, X. (2013). Influence of CTAB and SDS on the properties of oil-in-water nano-emulsion with paraffin and span 20/Tween 20. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 418, 60–67.

- Yang, H., Jin, X., Kei Lam, C. W., & Yan, S.-K. (2011a). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(11), 1773–1782.
- Yen, C.-C., Chen, Y.-C., Wu, M.-T., Wang, C.-C., & Wu, Y.-T. (2018). Nanoemulsion as a strategy for improving the oral bioavailability and anti-inflammatory activity of andrographolide. *International Journal of Nanomedicine*, 669–680.
- Yki-Järvinen, H. (1992). Glucose toxicity. *Endocrine Reviews*, 13(3), 415–431.
- Zeb, A. (2015). Phenolic profile and antioxidant potential of wild watercress (*Nasturtium officinale* L.). *SpringerPlus*, 4(1), 1–7.
- Zeng, J., Zhou, J., & Huang, K. (2009). Effect of selenium on pancreatic proinflammatory cytokines in streptozotocin-induced diabetic mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(7), 530–536.
- Zeng, L., Liu, Y., Pan, J., & Liu, X. (2019). Formulation and evaluation of norcanthridin nanoemulsions against the *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *BMC Biotechnology*, 19, 1–11.
- Zhang, F., Xu, Z., Gao, J., Xu, B., & Deng, Y. (2008). In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(2), 232–236.
- Zhang, L., Li, D., & Yu, S. (2020). Pharmacological effects of harmine and its derivatives: A review. *Archives of Pharmacal Research*, 43, 1259–1275.
- Zhang, X., Gregg, E. W., Williamson, D. F., Barker, L. E., Thomas, W., Bullard, K. M., Imperatore, G., Williams, D. E., & Albright, A. L. (2010). A1C level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*, 33(7), 1665–1673.

EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹	
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Galip Mesut DEMİR
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Biyokimya
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 2	% 15
II. Genel Bilgiler	% 26	% 35
III. Materyal ve Metod	% 27	% 35
IV. Bulgular	% 15	% 15
V. Tartışma	% 7	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tesis Yürütücüsü (Öğrenci)

Tesis Yürütücüsü

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük



Sayı : E-75296309-050.01.04-2100329631
Konu : HADYEK Kararı.

06.12.2021

ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 18.11.2021 tarihli ve E-93722986-000-2100315747 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.11.2021 tarihli ve 10 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 242 no'lu kararı ile söz konusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığınıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

TOPLANTI TARİHİ : 25.11.2021

TOPLANTI SAYISI : 10

KARAR N0 242: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mine GÜLABOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "**Harmin İçeren Taşıyıcı Sistemlerin Diyabetik Ratlar Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**" isimli araştırma çalışması ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 18.11.2021 tarihli ve E-93722986-000-2100315747 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.