





**T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORAL PROPİYONİK ASİT TÜKETİMİNİN  
SIÇANLARDA İNSÜLİN DİRENCİNE  
ETKİSİ**

**AYŞE ŞEYMA ÇOBAN**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. FATİH GÜLTEKİN**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI  
TIBBİ BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
OCAK/2023**

# İTHAF

“Aileme ithaf ediyorum”

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana her zaman yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, maddi ve manevi yanımda olan başta danışman hocam Prof. Dr. Fatih Gültekin olmak üzere; Dr. Öğr. Üyesi Saliha Uysal'a ve Vet. Hek. Mustafa Hilmi Yaranoglu'na teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamı yürüttüğüm Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi Müdürü Dr. Öğr. Üyesi Özgür Bulmuş'a, Veteriner Sağlık Teknikeri Mehmet Bozdemir'e ve tüm DEHAM çalışanlarına yardımları için teşekkür ederim. Projede bulunan laboratuvar analizleri için laboratuvar gereçlerini kullanmama izin veren Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'na teşekkür ederim.

Çalışma verilerinin istatistiksel değerlendirmesinde yardımcı için Öğr. Gör. Kürşad Nuri Baydili'ne teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini paylaşan, gelişimime katkı sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Yoğun geçen yüksek lisans tez sürecimde yanımda olan, yol gösteren arkadaşlarım Hatice Karakaş'a, Kübra İzler'e, Sümeyye Akın'a, Büşra Yaranoglu'na teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, büyüten, öğreten, maddi ve manevi destekleyen, her zaman kararlarımın arkasında duran ve bana inanan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğüne desteği için teşekkür ederim (Proje Numarası: 2021/091).

Ayşe Şeyma ÇOBAN

## İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. GIDA KATKI MADDELERİ: TANIMI, KULLANIM AMACI, GÜVENLİĞİ .....	3
2.2. GIDA KATKI MADDELERİ: KORUYUCULAR.....	5
2.3. PROPİYONİK ASİT VE TUZLARI (E280-283) .....	6
2.3.1. Propiyonik Asit Ve Tuzlarının Sağlık Üzerine Etkileri.....	7
2.4. YAĞ ASİDİ BAĞLAYICI PROTEİN 4 (FABP4).....	8
2.5. GLUKAGON .....	11
2.6. İNSÜLİN .....	12
2.7. İNSÜLİN DİRENCİ .....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. ETİK KURUL ONAYI VE DESTEK ALINAN KURULUŞ.....	16
3.2. ÇALIŞMADA BULUNAN ARAŞTIRMACILAR.....	16
3.3. ÇALIŞMANIN TÜRÜ .....	16
3.4. ÇALIŞMANIN YERİ .....	16
3.5. KULLANILAN GEREÇLER.....	17
3.5.1. Cihazlar ve Sarf Malzemeler .....	17
3.5.2. Laboratuvar Ölçüm Kitleri.....	17
3.5.3. Kimyasallar .....	18
3.5.4. İstatistik Programları.....	18
3.6. GÜÇ ANALİZİ VE ÖRNEKLEM SEÇİMİ.....	18
3.7. DENEYSEL YÖNTEM VE ÇALIŞMA PLANI.....	19
3.7.1. Deneyin Başlangıcı .....	19
3.7.2. Deney Süreci ve Yapılan İşlemler .....	20
3.7.3. Deneyin Sonlandırılması.....	23
3.8. LABORATUVAR ANALİZLERİ .....	24

3.8.1. ELISA Testleri .....	24
3.8.1.1. İnsülin Ölçümü .....	25
3.8.1.2. Glukagon Ölçümü.....	25
3.8.1.3. Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 4 (FABP4) Ölçümü.....	26
3.8.2. GC-MS Yöntemi ile Kalsiyum Propiyonat Ölçümü.....	26
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	27
3.10. ÇIKAR ÇATIŞMASI .....	27
3.11. ARAŞTIRMANIN KISITLILIKLARI.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. DENEY HAYVANLARININ ÖZELLİKLERİ .....	29
4.2. DAĞILIMIN NORMALLIĞI.....	29
4.3. GRUPLARIN KENDİ İÇİNDE TEKRARLI ÖLÇÜMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	30
4.4. GRUPLAR ARASINDA İLK VE SON ÖLÇÜMLERDEKİ DEĞİŞİMLER BAKIMINDAN KARŞILAŞTIRMALAR.....	35
4.5. GRUPLAR ARASINDA ÖLÇÜMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	37
5. TARTIŞMA .....	39
5.1. KAN PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	39
5.1.1. Glikoz Düzenlenmesi Üzerine Etkilerin Değerlendirmesi: İnsülin, Glukagon, FABP4 ve Glikoz.....	40
5.2. AĞIRLIK DEĞİŞİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	43
5.3. UNLU MAMULLERDE KALSİYUM PROPİYONAT KULLANIMINA YÖNELİK SON SÖZLER VE ÇIKARIM.....	45
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR .....	48
EKLER.....	52

## TABLÖLAR LİSTESİ

<b>Tablo 3.1:</b> Sıçanların ağırlıklarına göre alması gereken ml cinsinden çözelti miktarları tablosu.....	22
<b>Tablo 4.1:</b> Sıçanlara ilişkin temel betimsel bulgular .....	29
<b>Tablo 4.2:</b> Eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test) ölçüm sonuçları .....	30
<b>Tablo 4.3:</b> Gruplar arasında değişimler bakımından karşılaştırmalar .....	35
<b>Tablo 4.4:</b> Gruplar arasında ölçümlerin karşılaştırılması .....	37



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 2.1:</b> Avrupa Parlamentosu ve Konseyi (EC) 1333/2008 tüzüğü gıda katkı maddeleri sınıfları .....	4
<b>Şekil 3.1:</b> Sıçanlara uygulanan oral gavaj işlemi .....	20
<b>Şekil 3.2:</b> Sıçanlardan kardiyak kan alma işlemi .....	23
<b>Şekil 3.3:</b> Glukaon ELISA plakasının durdurma solüsyonu eklenmeden önceki görüntüsü .....	25
<b>Şekil 3.4:</b> FABP4 ELISA plakasının durdurma solüsyonu eklendikten sonraki görüntüsü .....	26
<b>Şekil 4.1:</b> 0. gün ve 8. hafta propiyonik asit düzeyi ortalamaları .....	31
<b>Şekil 4.2:</b> 0. gün ve 8. hafta insülin düzeyi ortalamaları .....	32
<b>Şekil 4.3:</b> 0. gün ve 8. hafta glukagon düzeyi ortalamaları .....	32
<b>Şekil 4.4:</b> 0. gün ve 8. hafta FABP4 düzeyi ortalamaları .....	33
<b>Şekil 4.5:</b> 0. gün ve 8. hafta glikoz düzeyi ortalamaları .....	34
<b>Şekil 4.6:</b> 0. gün ve 8. hafta ağırlık düzeyi ortalamaları .....	34
<b>Şekil 4.7:</b> Grupların 0. gün ve 8. hafta propiyonik asit ölçümleri farkı .....	36

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ADI</b>	: Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı
<b>ADK</b>	: Adenosin Kinaz
<b>EFSA</b>	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>FABP4</b>	: Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 4
<b>FAO</b>	: Gıda ve Tarım Örgütü
<b>FDA</b>	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
<b>GCGR</b>	: Glukagon Reseptörü
<b>GC-MS</b>	: Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
<b>GLP-1</b>	: Glukagon Benzeri Peptit – 1
<b>GKM</b>	: Gıda Katkı Maddeleri
<b>GRAS</b>	: Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
<b>HRP</b>	: Horseradish Peroksidazı
<b>INS</b>	: Uluslararası Numaralandırma Sistemi
<b>JECFA</b>	: Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi
<b>K</b>	: Kontrol Grubu
<b>KAK</b>	: Kodeks Alimentarius Komisyonu
<b>KZYA</b>	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri
<b>NDPK</b>	: Nükleozit Difosfat Kinaz
<b>NOAEL</b>	: Hiçbir Olumsuz Etkinin Görülmediği Düzey
<b>PA</b>	: Propiyonik Asit
<b>PD</b>	: Propiyonat Düşük Doz
<b>PY</b>	: Propiyonat Yüksek Doz

**SCF** : Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi

**WHO** : Dünya Sağlık Örgütü



# ORAL PROPİYONİK ASİT TÜKETİMİNİN SIÇANLARDA İNSÜLİN DİRENCİNE ETKİSİ

## ÖZET

**Amaç:** Kalsiyum propiyonat, ekmekte yaygın olarak kullanılan koruyucu özellikte bir gıda katkı maddesidir. Ekmek günlük beslenme rutininin önemli bir parçasıdır. Bu sebeple içeriğinde bulunan bileşenlerin dikkatle incelenmesi halk sağlığı açısından önemlidir. Bu çalışma ile kalsiyum propiyonatın kan şekeri düzenlenmesi üzerindeki etkileri incelenerek insülin direnci gelişimine sebep olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma, Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Wistar sıçanlar üzerinde yapılmıştır. Sıçanlar kontrol (n=11), düşük dozda (15 mg/kg/gün) kalsiyum propiyonat alan grup: PD (n=11) ve yüksek dozda (300 mg/kg/gün) kalsiyum propiyonat alan grup: PY (n=11) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. 11 haftalık sıçanlara oral gavajla 8 hafta boyunca kalsiyum propiyonat verilmiştir. Çalışmada sıçanların ağırlık değişimi, deney öncesi ve sonunda toplanan kan örneklerinde propiyonik asit, insülin, glukagon, FABP4 ve glikoz değerleri karşılaştırılmıştır. Propiyonik asit değeri GC-MS; insülin, glukagon ve FABP4 değerleri ELISA; glikoz değeri test stripleri ile ölçülmüştür. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde eşleştirilmiş örneklem t testi, tekrarlı ölçümler için ANOVA ve tek yönlü ANOVA kullanılmıştır.

**Bulgular:** Serum propiyonik asit değerlerinde PD grubunda başlangıca göre anlamlı bir artış görülmüştür. İnsülin, glukagon, FABP4, glikoz ve ağırlık parametrelerinde ilk ve son ölçümler arasında fark vardır ancak gruplar arasındaki fark incelendiğinde sonuç anlamlı değildir. Dolayısı ile kalsiyum propiyonatın bu parametreler üzerine bir etkisi görülmemiştir.

**Sonuç:** Bu sonuçlarla ekmekle oral olarak alınan kalsiyum propiyonatın sıçanlarda insülin direnci gelişimi üzerine bir etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ekmek, Gıda Katkı Maddeleri, İnsülin Direnci, Kalsiyum Propiyonat



# EFFECT OF ORAL PROPIONIC ACID CONSUMPTION ON INSULIN RESISTANCE IN RATS

## ABSTRACT

**Aim:** Calcium propionate is a preservative food additive widely used in bread. Bread is an important component of the daily diet. For this reason, it is significant to examine the ingredients in its content carefully for public health. In this study, it was aimed to investigate the effects of calcium propionate on blood glucose regulation and to investigate whether it causes the development of insulin resistance.

**Materials and Methods:** The study was carried out on Wistar rats at Balikesir University Experimental Animal Production, Care, Application and Research Center. Rats were control (n=11), low dose (15 mg/kg/day) calcium propionate group: PD (n=11) and high dose (300 mg/kg/day) calcium propionate group: PY (n=11) were divided into three groups. Calcium propionate was given to 11-week-old rats for 8 weeks by oral gavage. In the study, weight change of rats, propionic acid, insulin, glucagon, FABP4 and glucose values in blood samples collected before and at the end of the experiment were compared. Propionic acid value GC-MS; insulin, glucagon and FABP4 values ELISA; glucose value was measured with test strips. Paired sample t-test, repeated measures ANOVA and one-way ANOVA were used for statistical evaluation of the data.

**Results:** There was a significant increase in serum propionic acid values in the PD group compared to baseline. There is a difference between the first and last measurements in insulin, glucagon, FABP4, glucose and weight parameters, but the result is not significant when the difference between the groups is examined. Therefore, no effect of calcium propionate on these parameters was observed.

**Conclusion:** With these results, it was concluded that calcium propionate taken orally with bread has no effect on the development of insulin resistance in rats.

**Key Words:** Bread, Calcium Propionate, Food Additives, Insulin Resistance

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beslenme; Maslow'un ihtiyalar hiyerarşisine göre ilk basamak olan temel fizyolojik ihtiyalardandır (1). Sanayi devrimine kadar beslenme, ekseriya insanın hayatta kalması için yaptığı bir eylemken sanayi devriminden sonra üretim artması ve gıdaya ulaşımın kolaylaşması gibi sebeplerle sadece fizyolojik ihtiyaç karşılama amacından çıkıp ihtiyaçtan fazlasını tkietmeyle sonuçlanmıştır (2). İnsan doğası gereği ihtiyandan fazla olan enerjiyi depolama eğilimindedir. Yine sanayi devrimiyle beraber basit karbonhidratların, şekerleme-pasta türevi gıdaların tkietimi artmış ve bu da makro besin ögelerinden dengesiz beslenmeyle sonuçlanmıştır. Aynı zamanda üretim artması ve gıdaların ömrünü uzatmak için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaya başlanmıştır (3). Fazla gıda tkietimi hem makro besin ögelerinin dengesinin değişmesine hem de katkı maddelerini içeren paketli gıdaların beslenme rutinine alınmasıyla farklı fizyolojik tepkilere yol açmaktadır. Alınan fazla enerji, dengesiz beslenme ve zararlı etkileri olabilen katkı maddelerinin tkietiminin artması; metabolizmanın etkilenmesine, adipoz dokunun artmasına/obeziteye, glisemik kontrolün değişmesine, insülin direncine ve diğer pek çok sağlık sorununa yol açmaktadır.

Bir gıda katkı maddesi olan propiyonik asit; lezzet verici ve koruyucu özelliği ile gıdalara eklenen, mantar gelişmesini önleyici bir kısa zincirli yağ asididir (4). Endojen olarak bağırsak bakterileri tarafından da üretilen bu kf önleyici özellikle unlu mamullerde ve peynirlerde kullanılır (4,5). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority: EFSA) kalsiyum propiyonatın güvenli olduğunu kabul etmiş ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (U.S. Food and Drug Administration: FDA) tarafından genel olarak güvenli (Generally Recognized as Safe: GRAS) onayı almıştır (6,7). Ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi'nde yer almaktadır ve kullanımına izin verilmiştir (8). Bununla beraber propiyonat tkietiminin bazı biyolojik ve metabolik etkileri belirsizdir (5).

Propiyonik asidin kalsiyum tuzu olan kalsiyum propiyonatın (E282) insülin üzerine etkileri güncel bir tartışma konusudur. Mevcut literatür, oral yolla verilen propiyonatın insülin direnci ve glikoz intoleransı dahil olmak üzere bazı metabolik etkilere neden olabileceğini öne sürmektedir (5,9). Fakat propiyonatın insülin direnciyle ilişkisine dair çalışmalar hem sayıca azdır hem de çok yenidir.

Sağlıklı bir diyetle ekmek önemli bir yer tutmaktadır. Paketli ekmeklerin içeriğinde bulunan katkı maddelerinin güvenliği halk sağlığını doğrudan ilgilendirmektedir. Kalsiyum propiyonat ekmekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tezle, dışarıdan alınan kalsiyum propiyonatın insülin direnciyle ilişkili parametrelerden insülin, glukagon ve FABP4 hormonu seviyelerine etkileri araştırılarak glisemik yanıtta olan etkileri ortaya koyulmaya çalışılacaktır.

Obezite ve insülin direncinin gelişmesinde ekmek tüketimi suçlanmaktadır. Ekmek tüketimiyle beraber, belki onun kadar önemli olan ve gözden kaçan bir husus olarak, ekmeklerde kullanılan bu koruyucunun bu hastalıkların oluşmasındaki rolünün ortaya koyulması toplum sağlığının korunmasında önemli bir katkı sağlayacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde öncelikle gıda katkı maddeleri, gıda koruyucular, propiyonik asit ve tuzları başlığı altında kalsiyum propiyonat ele alınacaktır. Daha sonra sırasıyla; propiyonatin artırdığını düşündüğümüz ve insülin direnciyle ilişkili bir hormon olan yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4), glisemik kontrolü sağlayan temel hormonlar glukagon ve insülin, son olarak da insülin direnci anlatılacaktır.

### 2.1. GIDA KATKI MADDELERİ: TANIMI, KULLANIM AMACI, GÜVENLİĞİ

Gıda katkı maddesi, Türk Gıda Kodeksi'ne ait Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre; besleyici değerine bakılmaksızın tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve eklendiği gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, üretim, işlenme, paketlenme, taşınma ve depolanma süreçlerinin tamamında gıdaya eklenmesi sonucunda, eklendiği gıdanın bileşeni olan tüm maddeleri içerir (10). Daha genel bir ifade edişle gıdaya bir amaca uygun olarak, doğrudan veya dolaylı bir şekilde eklenen herhangi bir maddedir (11).

Dünya nüfusunun artışı ve modern hayatın sonucu olarak gıdaya talep artmıştır. Bu ihtiyacın karşılanabilmesi ve aynı zamanda gıdaların üretimden tüketime kadarki sürecinde bozulmadan kalması, maddi kayıpların ve gıda israfının önüne geçilmesi gıda katkı maddeleri (GKM) sayesinde olmaktadır. GKM ile besinler küf, bakteri ve benzeri kaynaklı bozulmalardan korunurken aynı zamanda gıdaların kendi kimyasal özelliklerinden kaynaklanan oksidasyon ve kötü tat geliştirme gibi durumları da önlenir. Böylece gıdanın güvenliğini sağlar, raf ömrünü uzatır ve tazeliğini korur.

Gıdaların görünüm, tat ve koku gibi duyuşsal özelliklerinin iyi olması besin seçimini etkilemektedir. Yiyeceklerin tadını geliştiren, renk, tat ve dokusunu iyileştiren katkı maddeleri kullanılan ürünler tüketicilere daha cazip gelebilir.

Gıda katkı maddeleri gıdaların iyileştirilmesi ve korunmasına hizmet ettiği gibi tüketicilerin de ihtiyaçlarına yönelik kullanılabilir. Gıdanın kalitesini artırmak, işlenirken kaybolanları telafi etmek için ürünler vitaminler, mineraller ve lif gibi besin öğeleri ile zenginleştirilebilir (11,12).

GKM'nin fonksiyonel sınıflandırılması Şekil 2.1'de gösterilmiştir (13).

Tatlandırıcılar	Renklendiriciler	Koruyucular	Antioksidanlar	Taşıyıcılar	Asitler
Asitlik Düzenleyiciler	Topaklanmayı Önleyici Maddeler	Köpük Önleyiciler	Hacim Arttırıcılar	Emülgatörler	Emülsifiye Edici Tuzlar
Sertleştiriciler	Aroma Arttırıcılar	Köpük Oluşturucular	Jelleştirici maddeler	Parlatıcılar	Nem Vericiler
Modifiye Nişastalar	Ambalajlama Gazları	İtici Gazlar	Kabartıcılar	Metal Bağlayıcılar	Stabilizatörler
		Kıvam Arttırıcılar	Un İşleme Maddeleri		

**Şekil 2.1:** Avrupa Parlamentosu ve Konseyi (EC) 1333/2008 tüzüğü gıda katkı maddeleri sınıfları

Gıda katkı maddelerinin güvenliğinin araştırılması, değerlendirilmesi, sağlık ve uygulama yönünden standartlaştırılması ve denetimlerinin yapılmasından sorumlu uluslararası kuruluşlar bulunmaktadır. Bunlar:

- Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations) Ortak Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (**JECFA:** The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives),
- FAO ve WHO tarafından ortaklaşa kurulan Kodeks Alimentarius Komisyonu (**KAK**),
- Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (**SCF:** Scientific Committee on Food)
- Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (**FDA:** United States Food and Drug Administration),
- Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (**EFSA:** European Food Safety Authority)'dir (14).

Türkiye’de GKM konusunda yetkili kurum Tarım ve Orman Bakanlığı’dır (10). Türkiye 1963 yılından bu yana KAK’a üye ülkeler arasındadır.

JECFA, GKM’yi toksisite araştırmalarına tabi tutarak bazı güvenlik ve risk değerleri belirlemiştir. Hiçbir olumsuz etkinin gözlemlenmediği düzey NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) ve kabul edilebilir günlük alım miktarı ADI (Acceptable Daily Intake) bunlardan bazılarıdır (15).

Denetimsiz bir şekilde GKM kullanımının önüne geçmek ve bir standart belirlemek için numaralandırma sistemi kullanılmıştır. Kodeks Alimentarius Komisyonu Uluslararası Numaralandırma Sistemi (INS: International Numbering System)’ni geliştirmiştir (16). Avrupa Birliği ülkelerinde EFSA’nın izin verdiği katkı maddeleri “E numaraları” katoloğunda listelenmiştir (17). Gıdaların etiketlerinde gördüğümüz katkı maddesi numaraları bu INS numaralarıdır. Başında yer alan “E” harfi “European Union”ı ifade etmektedir. GKM,’nin etiketlerde E kodları ya da sadece INS numaralarıyla kullanılması ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Türkiye Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği Avrupa Birliği mevzuatına uyum çerçevesinde hazırlanmıştır ve bu yüzden GKM etiketlerde E kodları ile kullanılır (18).

Gıda katkı maddelerinin kullanım güvenliği ile ilgili yapılan yeni araştırmalarla bu listeler zaman zaman güncellenmektedir. Yeni kullanılmaya başlanan GKM’lere E kodları atanırken bazı E numaraları da listeden çıkarılır. Avrupa Birliği tarafından onaylanan GKM kullanım amaçlarına göre; renklendiriciler (E100–E199), koruyucular (E200–E299), antioksidanlar ve asitlik düzenleyiciler (E300–E399), kıvam arttırıcılar, stabilizatörler ve emülgatörler (E400–E499), topaklanmayı önleyiciler (E500–E599), lezzet arttırıcılar (E600–E699), antibiyotikler (E700–E799), parlaticı maddeler, gazlar ve tatlandırıcılar (E900–E999) ve ek katkı maddeleri (E1000–1599) şeklinde listelenmiştir (19).

## **2.2. GIDA KATKI MADDELERİ: KORUYUCULAR**

Gıda koruyucuları, mikroorganizmaların sebep olabileceği bozulmalardan gıdaları koruyan GKM’dir. Hem tüketicileri olası bir gıda zehirlenmesine karşı korur hem de ürünün bozulmasını önleyerek raf ömrünü uzatır (4).

Gıda katkı maddelerinin her sınıfında olduğu gibi koruyucularda da sağlık riski taşıyanlar ve şimdiye kadar zararı bildirilmemiş, kullanımını güvenli olanlar mevcuttur.

Örneğin gıda koruyuculardan sorbik asit ve tuzu (E200,202), benzoik asit ve tuzları (E210-213), natamisin (E235) ve propiyonik asit ve tuzları (E280-283)'nın genotoksik etki gibi riskli etkilerinin olabileceği bildirilmiştir (20–23). Ayrıca parabenler (E214-219), nitrat ve nitritler (E251-252), kükürt dioksit (E220), fumarik asit (E297)'in bazı hastalıklara neden olabileceği ve riskli olduğu bilinmektedir (4).

Bunun yanında gıda koruyucular içinde; asetik asit (E260), boraks (285), dimetil dikarbonat (E242), etil laurol alijinat (E243) ve karbon dioksit (E290) katkılarının, gıdalarda kullanılmasına müsaade edilen miktar kadar tüketilmesinde, bugüne kadar yapılan çalışmalarda herhangi bir olumsuz etki bildirilmemiştir (4).

### **2.3. PROPİYONİK ASİT VE TUZLARI (E280-283)**

Propiyonik asit (PA), yağ asidi özelliği taşıyan en kısa organik asittir. 1844 yılında Yunanca “protos” (ilk) ve “pion” (yağ) kelimelerinden yola çıkılarak tanımlanmıştır (24).

Diyet lifinin bağırsak bakterileri tarafından fermantasyonu ile kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) oluşmaktadır. Bunlardan bir tanesi de propiyonik asittir. Propiyonik asit, kolona ulaşan besinlerin heksoz ve pentoz moleküllerine parçalanmasının ardından son ürün olarak oluşan piruvattan süksinat dekarboksilasyon yolu ve akrilat yolu olmak üzere 2 farklı yolla üretilir. Üretilen propiyonik asitin çoğu emilir ve portal vene geçer. Yaklaşık %90'ı karaciğer tarafından metabolize edilir. Propiyonik asit önce propiyonil-CoA'ya dönüştürülür ve ardından propiyonil-CoA'nın süksinil-CoA'ya dönüştürülmesiyle krebs döngüsüne katılır. Metabolize edilmeyen propiyonik asit periferik kana taşınır. Endojen olarak üretilen KZYA'lar, bazı sağlığı geliştirici etkileriyle anılmaktadır ancak propiyonik asitin etkileri tartışmalıdır (25,26).

Propiyonik asitin bağırsak içinde patojenik bakterilere karşı antimikrobial etkisi olduğu bilinmektedir. Gıda endüstrisinde de küf ve mantarların gelişmesini önlemek için koruyucu olarak kullanılır (26).

Gıdalarda E280 kodu ile bulunan propiyonik asitin tuzları da antimikrobiyal etkili gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bunlar;

**Sodyum propiyonat (E281):** Hidrojen peroksit ve su içerisinde propiyonik asit ve sodyum hidroksitin reaksiyonuyla üretilir. Daha sonra ürün filtrelenir, püskürtülerek kurutulur, paketlenir (6). Unlu mamuller ve peynir ürünlerinde 3000 mg/kg, et

preparatları, işlenmiş etler ve işlenmiş balıklarda 5000 mg/kg'a kadar kullanımı güvenlidir (27).

**Kalsiyum propiyonat (E282):** Su içerisinde bir topaklaştırıcı varlığında propiyonik asit ve kalsiyum oksitin reaksiyonuyla üretilir (6). Unlu mamuller, peynirler, jelatinler, şekerlemeler ve buzlu şekerlemeler, pudingler ve dolgularda iyi üretim uygulamasını aşmayacak şekilde kullanılması genel olarak güvenli (GRAS: Generally Recognized as Safe) kabul edilmiştir (7).

**Potasyum propiyonat (E283):** Üretim yöntemlerine ilişkin net bir bilgi bulunmamaktadır (6).

Türk Gıda Kodeksi PA ve tuzlarını; yalnızca hazır ambalajlı dilimlenmiş ekmek ve çavdar ekmeğinde 3000 mg/kg, yalnızca enerjisi azaltılmış ekmek, kısmen pişirilmiş hazır ambalajlı ekmek, hazır ambalajlı sandviç ekmeği, tortilla ve pide, hazır ambalajlı pølsebrød, boller ve dansk flutes içinde 2000 mg/kg ve yalnızca hazır ambalajlı ekmekte 1000 mg/kg'a kadar kullanılmasına izin vermiştir (8).

Propiyonik asit şu anda kimyasal yollarla petrokimyasallardan üretilmektedir. Fermantatif yöntemlerle de eldesi vardır. Ancak maliyetinin yüksek olması sebebiyle henüz kimyasal üretimin yerini alacak düzeyde değildir (24).

### **2.3.1. Propiyonik Asit Ve Tuzlarının Sağlık Üzerine Etkileri**

Katkı maddesi olarak tüketilen propiyonik asit ve tuzları, gıda katkı maddesi otoriteleri tarafından güvenli kabul edilse de zararlarına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır.

Propiyonik asit verilen sıçanlarda ön mide epitalyel hiperplazisi geliştiği bilinmektedir. PA maruziyetinin kesilmesinin ardından tedavi verilmeksizin sekiz haftada tersine dönmüştür (7). Diyetle % 4 PA alımının sıçanlarda ön mide tümörüne sebep olduğu gösterilmiştir Ancak insanlarda ön mide yoktur. Ön mide ile aynı hücreleri içeren ağız, yutak, yemek borusu için risk bulundurabilir (28).

Gıda koruyucu olarak kullanılan kalsiyum propiyonata maruz kalan insan lenfositlerinde *in vitro* DNA hasarı ve genotoksik etki bildirilmiştir (29).

Dolaşımdaki PA kan beyin bariyerini geçer ve enerji metabolizması, lipid metabolizması, nörotransmitter sentezi ve salınımı gibi çoklu hücre sinyalleşme

süreçlerini modüle eder (30). Yüksek propiyonik asit düzeylerinin merkezi sinir sistemini nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir (31).

Propiyonik asit ile otizm spektrum bozukluğu arasında ilişki kurulan çalışmalar bulunmaktadır. Propiyonik asidemi tanısı alan 12 vakanın takip edildiği bir çalışmada sekiz hastanın otistik özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (31). Aynı zamanda otizmlili bireylerin dışkılarında diğer KZYA'lara göre yüksek düzeyde PA tesbit edilmiştir. Öncesinde disbiyozu bulunan gebenin PA içeren işlenmiş gıdalarla beslenmesi, gastrointestinal sisteminde PA birikmesine, oradan dolaşıma geçip plasenta bariyerini aşması sonucunda embriyoda nöral farklılaşmaya neden olabilir. PA'ya maternal dönemde maruziyetin embriyonun nöral gelişiminin erken dönemlerinde glial hücrelerin aşırı çoğalması, artmış inflamatuvar profille sonuçlanan bozulmuş nöral örüntü ve anormal nöral mimari gibi otizmin olası öncüllerine sebep olduğu düşünülmektedir. Ancak PA'nın tam olarak otizm gelişimine nasıl dahil olduğu bilinmemektedir (30).

Avustralya'da, çocuklarda kalsiyum propiyonatın davranışlara etkisinin incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Kalsiyum propiyonat eklenmiş ekmeği tüketen çocuklarda huzursuzluk, sinirlilik, uyku bozukluğu gibi sorunlar gözlenmiştir (32). Benzer şekilde sıçanlara doğum sonrası 5. ve 28. günler arasında kronik propiyonat uygulanmasının davranışsal kusurlara sebep olduğu tespit edilmiştir (33).

Gıda koruyucu olarak kullanılan propiyonatın glikoz metabolizmasını etkilediği rapor edilmiştir. Eksojen PA alımının etkilerinin araştırıldığı bu çalışmalarda glukagon, norepinefrin, FABP4 hormonlarını ve endojen glikoz üretimini artırdığı gözlenmiştir. Oral PA tüketimi insülin karşıtı düzenleyici hormon sisteminin uygunsuz biçimde aktive etmektedir. Bu etkilerle PA potansiyel bir metabolik bozucu olabilir (5,34).

#### **2.4. YAĞ ASİDİ BAĞLAYICI PROTEİN 4 (FABP4)**

Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinler (FABPs), hücre içindeki trafiği ve yanıtları düzenleyen lipid şaperonlarıdır (35). Doymuş ve doymamış uzun zincirli yağ asitleri, eikosanoidler, lökotrienler ve prostoglandinler gibi hidrofobik ligandlar için yüksek afiniteye sahiptir ve geri dönüşümlü olarak bağlanırlar (35–38). Kütlesi 14 ila 15 kDa'dır. FABPs'nin dokuz tipi tanımlanmıştır. Bu izoformların eksprese edildiği dokular ve isimlendirmeleri sırasıyla karaciğerde FABP1 (L-FABP), intestinal FABP2 (I-FABP), kalp FABP3 (H-FABP), adiposit FABP4 (A-FABP/aP2), epidermal FABP5 (E-

FABP/mal1), ileal FABP6 (II-FABP), beyin FABP7 (B-FABP), miyelin FABP8 (M-FABP) ve testis FABP9 (T-FABP)'dur (35). FABP'lerin yapı bakımından birbirine çok benzer iki izoformu aP2(FABP4) ve mal1 (FABP5)'dir (36).

Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4), çoğunlukla adipositlerde ancak aynı zamanda makrofajlarda ve endotelial hücrelerde de üretilen sitozolik proteinlerdir (36,37). Adipositlerde en çok bulunan proteinlerden biri olan FABP4 hormona duyarlı lipaz (HSL) ve peroksizom PPAR- $\gamma$  ile etkileşerek adiposit homeostazının korunmasında, lipoliz ve adipogenezin düzenlenmesinde rol oynar (2).

FABP4'ün temel görevi hücre içi trafiğe aracılık etmek ve yağ asitlerini hedeflemektir(37). Geleneksel olarak hücre içi lipid şaperon olarak hareket etmektedir; lipidlerin taşınmasını, metabolizmasını ve depolanmasını düzenler. Pankreas  $\beta$ -hücreleri, hepatositler, makrofajlar gibi periferik hücreleri etkilemektedir (37,39). Obezite, insülin direnci, tip2 diyabet, ateroskleroz ve kardiyovasküler olaylar gibi metabolik bozukluklarda serumdaki FABP4 yükselir (36,37,40–42).

Metabolik hastalıklar ve FABP4 arasındaki ilişkiyi anlamak için yapılan çalışmalar FABP4'ün "knockout" edilmesi (susturma) yoluyla sağlanmıştır. FABP4 yoksunluğunun etkilediği 2 önemli süreç vardır. Bunlar; non esterifiye yağ asidinin (NEFA) yağ dokudan daha az salınması ve dokularda yağ asitleri yerine daha fazla glikoz kullanılmasıdır (43).

FABP'lerin makrofajların ve adipositlerin inflamutuar yanıtını düzenlediği ayrıca makrofajların adipositlerdeki insülin etkisini düzenlemesi için önemli olduğu bulunmuştur. Hem adipositlerdeki hem de makrofajlardaki FABP'lerin her ikisi de insülin direncinin gelişmesinde rol oynamaktadır. Aynı çalışmada FABP eksikliği olan farelerde tüm vücut insülin duyarlılığının arttığı, yağ dokusunda reseptör sinyalleme kapasitesinin arttığı gösterilmiştir (36). Obez farelerde FABP4 nakavt edildiğinde glikoz ve lipid metabolizmasının önemli ölçüde iyileştiği gözlemlenmiştir. Obezitede FABP4 eksikliğin periferik insülin direncini iyileştirdiği ve pankreas beta hücre fonksiyonunu koruduğu anlaşılmıştır (40). Aynı zamanda FABP4'ün açlık durumunda adipositlerden salgılandığı ve hepatik glikoz üretimini düzenlediği gösterilmiştir (44). Yağ dokusundaki FABP4 eksikliği insülin gibi çalışan C16:1n7-palmitoleat üretimini artırmaktadır ve bu mekanizma aracılığıyla lipid şaperonlarının karaciğer lipogenezini ve kas glikoz kullanımını düzenlemektedir (45).

*TNF- $\alpha$*  ve *ob* gibi genlerin yağ dokusunda eksprese edildiği ve insülin direncinde rol oynadığı bilinmektedir. *TNF- $\alpha$*  insülin reseptörünün insülin ile uyarılan tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. FABP4'ün serbest yağ asitlerini hedef hücrelerde bağlayarak *TNF- $\alpha$* 'nın veya insüline etki eden diğer genlerin ifadesini artırabileceği ve dolayısı ile insülin direncine sebep olabileceği düşünülmektedir. Obez ve FABP4 nakavt farelerin yağ dokularında *TNF- $\alpha$*  ekspresyonu obez ve FABP4 nakavt edilmemiş farelerden daha düşük olarak bulunmuştur (46).

FABP4 plazmada bol miktarda bulunmaktadır. Son yıllarda obezite ve metabolik sendrom gibi hastalıkların plazma FABP4 konsantrasyonu ile bağlantılı olduğu ortaya konmuştur. FABP4 hücre içi görev yaptığı gibi aynı zamanda hücre dışı ortama da salınmaktadır ve hücre dışı ortamda glikoz üretimi, glukoneojenik aktiviteyi düzenleme gibi rolleri vardır. Olgun insan izole adipositlerinin FABP4'ü hücre dışı ortama *in vitro* salgıladığı gösterilmiştir. Obez deneklerde FABP4'ün kardiyak kontraktıl disfonksiyona sebep olabileceği bulunmuştur (41). Obezite ile kardiyak hastalıklar arasında ilişki kurulmaktadır ancak bu ilişkinin nereden kaynaklandığı tam olarak açıklanmamıştır. Bu durumda olası bir senaryonun FABP4'ten ileri geldiği düşünülebilir. FABP4 aktif olarak salgılanan bir protein midir ve yağ dokusunu hedef organlara bağlayan bir endokrin/parakrin hormon olarak görev yapar mı konusunda tam bir netlik yoktur. Çünkü FABP4'ün birincil dizisinde bir salgı sinyali bulunmamaktadır. Bu nedenle salgılama mekanizması açıklanamamaktadır (37). Proteinlerin hücreden salınımı için klasik yol olan endoplazmik retikulum – golgi yolağından farklı bir salınımı bulunmaktadır. Adipositlerden lipoliz ile ilişkili olarak salınmaktadır. Hücre içi kalsiyum artışına cevap olarak da kalsiyum bağlantılı salınımı bulunmaktadır(37,43)

FABP4'ün tip2 diyabet, ateroskleroz gibi obezite ile bağlantılı hastalıkların oluşmasında önemli bir rolü olduğunun bilinmesinin yanı sıra anjiyogenez, inflamasyon, tümör oluşumu gibi biyolojik süreçlerde de yer aldığı anlaşılmıştır (37,47,48).

Görüldüğü gibi FABP4'ün pek çok metabolik hastalıkla ilişkisi bulunmaktadır ancak yakın zamana kadar hiçbir etki mekanizması tanımlanamamıştır. 2021 yılında yayınlanmış bir çalışmada FABP4'ün adenosin kinaz (ADK) ve nükleozid difosfat kinaz (NDPK) ile bir hormon kompleksi oluşturduğu bulunmuştur. Daha önce bilinmeyen bir hormon olan ve “Fabkin” olarak adlandırdıkları bu FABP4-ADK-NDPK kompleksinin enerji durumunu metabolik organların işleyişiyle ilişkilendiren bir etki mekanizması

vardır. Diyabet gelişimi ve lipoliz kontrolünde kritik olan beta hücreleri üzerinde bu hormonun önemli bir etkisi bulunmaktadır. Fabkin hormonunun antikor aracılı hedeflenmesinin metabolik sonuçları ve beta hücre fonksiyonunu iyileştirdiği, diyabeti önlemek için beta hücre bütünlüğünü koruduğu tesbit edilmiştir (42).

Tüm bu hastalıklarla bağlantısı olan yağ asidi bağlayıcı proteinlerin -özellikle de FABP4'ün- metabolik hastalıkları tedavi etmek için potansiyel ilaç hedefleri olarak kullanılması olasıdır (36,42).

## 2.5. GLUKAGON

Glukagon, kan şekeri düzeyinin düşmesine yanıt olarak pankreasın  $\alpha$ - hücrelerinden salgılanan 29 amino asitli peptit yapıda bir hormondur. Tokluk durumunda düşük olan glukagon seviyeleri uzun süreli açlık ya da hipoglisemi durumunda 2-3 kat artar (49). Açlık durumunda kandaki glikoz düzeylerini kontrol eden glukagon, ana insülin karşı-düzenleyici hormondur (50).

Glukagon karaciğerde glukoneogenez ve glikojenolizi uyararak kan şekerini artırır. Aynı zamanda glikojenezi ve glikolizi inhibe eder (51). Bu etkiyi karaciğerdeki G proteinine bağlı bir reseptör olan glukagon reseptörü (GCGR) aracılığıyla gerçekleştirir (49). GCGR aktivasyonu ile adenilat siklaz aktive olur ve hücre içi cAMP seviyeleri artar. Ardından protein kinaz A aktivasyonu olur ve hepatik glikoz çıkışı düzenlenir (51).

Glukagon reseptörleri az miktarda böbrekte, kalpte, beyinde, adipositlerde, lenfoblastlarda, adrenal bezde retinada ve gastrointestinal sistemde de üretilir. Karaciğer dışındaki dokularda GCGR eksprese ediliyor olması glukagonun sadece glikoz homeostazında görev almadığını ve metabolizmada başka görevlerinin olduğunu ortaya koymaktadır (52).

Glukagonun en bilinen etkisi kan şekerini artırma etkisidir. Ancak glisemik olmayan etkileri de bulunmaktadır. Bunlar; gıda alımının ve tokluğun düzenlenmesi, enerji harcaması, lipid homeostazı ve insülin salgılanmasıdır. Glukagonun tokluk duyusuna etkisinin karaciğer-vagus-hipotalamus üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Enerji harcamasını artırma yeteneği ise termojenik etkisinden kaynaklanabilmektedir. Glukagonun termojenik etkisi hızlıdır ve dolaşıma verildikten sonra oksijen tüketiminin arttığı gözlenmiştir. Glukagon daha çok kahverengi yağ dokusu

üzerinde etki ederek enerji harcamasını uyarmaktadır ancak kahverengi yağ dokusu hiç bulunmayan hayvan türlerinde de termojenezi etkilediği bilinmektedir (49).

Glukagonun lipid metabolizması için önemli bir rolü bulunmaktadır. Karaciğere etki eden glukagon lipid sekresyonunu azaltabilir ve hepatik lipid birikimini azaltabilir. Kemirgenlerde adipositlerinde glukagonun lipolizi artırdığı bulunmuştur ancak insanlarda adipositlerde böyle bir etki tartışmalıdır (53).

Glukagon yaygın olmasa da aynı zamanda insüline bağımlı diyabet hastalarında hipoglisemi tedavisi olarak kullanılabilir (50). Türk Diyabet Derneği tanı ve tedavi rehberi, Amerikan Diyabet Derneği ile Avrupa Diyabet Çalışmaları Derneği yönergelerinde yoğun insülin tedavisi başlanan hastalara glukagon reçete edilmesi gerektiğine dair uyarı mevcuttur (54,55). Subkutan veya intramusküler enjeksiyon olarak uygulanan glukagon, hastane dışında uygulanabilen bir yöntem olması açısından önemlidir. Acil müdahale ekipleri gelene kadarki süre içinde uygulanması hastane yatışını ve hipoglisemi sebebiyle oluşabilecek etkileri düşürebilmektedir (50). Minimal dozlarda eklenen glukagon bile kan glikozunu uzun süre artırabilir (56).

Glukagon hipoglisemiye karşı koyduğu gibi aynı zamanda enerji harcamasını da artırmaktadır. Plazma glikoz konsantrasyonlarının glukagon salınımını inhibe edeceği bir düzeydeyken de glukagon salgılanabilir. Birbirine ters gibi duran bu etkiler glukagonun strese yanıt olarak yükselmesi ile ilişkilendirilebilmektedir. Travma, yanıklar, kanama, kalp durması, cerrahi müdahaleler ve hipoksi gibi akut fiziksel streste de plazmada glukagon yükselmektedir (57).

Glukagon salgılanmasının inhibisyonu kan glikozunun artması, insülin miktarının artması ve somatostatin ile gerçekleşmektedir (58,59).

## **2.6. İNSÜLİN**

İnsülin, pankreasın  $\beta$ -hücrelerinden salgılanan, birbirine iki disülfid köprüsüyle bağlı, 21 aminoasit içeren A zinciri ile 30 amino asit içeren B zincirinden oluşan polipeptit yapıda bir hormondur. Biyosentezi sırasında, A zinciri ile B zinciri arasında disülfid köprülerinin oluşmasında gerekli konformasyonun sağlanması için, C peptit olarak da bilinen C zinciri ile A ve B zincirleri bağlanır. Disülfid köprülerinin kurulmasından sonra C peptit ayrılır ve olgun insülin sentezlenmiş olur (60). C peptit insüline eşit miktarda üretilir ve endojen insülin miktarının iyi bir göstergesidir (61).

İnsülin salınımının ana düzenleyicisi hiperglisemidir (62). Glikoz, pankreasın  $\beta$ - hücrelerinden insülin salgılanmasını iki yolla uyarır. Tetikleyici yol, insülin salgılanmasının ilk fazıdır. İnsülin salınımının zirve yapması ve glikoz uyarandan sonraki ilk 10-20 dakikadaki düşüş sürecini kapsar. Güçlendirici yol ise bir öğünden sonraki tüm aşamalar boyunca düşük ama sürekli bir hızda insülin salgılanmasıdır. Tetikleyici yoldan salgılanan insülin, toplam insülin salgılanmasının yaklaşık %15'i iken geri kalan güçlendirici yoldan salgılanır (63,64). İnsülin salgılanmasını kan glikozu haricinde de uyarılar vardır. Bunlar; belirli amino asitler ve yağ asitlerinin kandaki yükselmesi, pankreasın  $\alpha$ -hücrelerinin ürettiği proglukagon türevi peptitler ve gastrointestinal sistemden salgılanan inkretin hormonlarıdır. İnkretin hormonları, gıda alımına yanıt olarak salgılanan bağırsak hormonlarıdır ve dolayısıyla diyet bileşimi ile insülin salınımını ilişkilendirir (62,64).

Dolaşımdaki insülin glikozun kandaki uzaklaştırılmasını, karaciğerden glikoz salgılanmasının baskılanmasını belirleyen birincil etkidir. Gıda alımını azaltır, tokluk sinyallerini düzenler, mide boşalmasını azaltır, pankreastan glukagon salgılanmasını, pankreatik ve gastrik enzim salgılanmasını inhibe eder (58).

İnsülin hedef dokularda etkisini iki  $\alpha$  ve iki  $\beta$  olmak üzere dört bölümden oluşan membran reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir. Reseptöre bağlanan insülin, reseptörün otofosforilasyonu ile tirozin kinazı aktive eder. Tirozin kinaz İnsülin Reseptör Substrat-1 gibi proteinlerin fosforilasyonunu uyarır. İnsülinin etki ettiği hedef dokular karaciğer, kas ve yağ dokusudur. İnsanlarda bir günde 40-50 ünite insülin salgılanır. Anabolik bir hormon olan insülin, karaciğer ve kas dokularında glikolizi ve glikojenezi, adipoz dokuda lipojenezi ve bazı dokularda protein sentezini uyarır (60,65).

İnsülin kan beyin bariyerini geçer ve merkezi sinir sistemindeki insülin reseptörlerine bağlanır. Beyin insülin sinyali iştah, termojenez, lipoliz, dallı zincirli amino asit metabolizması, trigliserit sekresyonu ve hepatik glikoz üretimini düzenler (66).

İnsülinin aşırı salınması ya da dışardan uygulanması hipoglisemiyi ciddi boyutlara ulaştırabilir veya ölümcül olabilir (67). Hipoglisemi durumunda, pankreasın  $\beta$ - hücrelerinde insülin sekresyonu baskılanır (56). Somatostatin, adrenalin,  $\alpha$ - adrenerjik agonistler,  $\beta$ - adrenerjik blokerler ve aynı zamanda stress, egzersiz, travma gibi durumlar insülin salgılanmasını inhibe eder (58,60).

İnsülin yıkımı karaciğerden iki geçiş sırasında ve adiposit gibi diğer hücrelerde gerçekleştirilir ve bu insülinin yalnızca bir kısmının yıkımını kapsar. İnsülinin karaciğerden ikinci geçişinden sonra dolaşımında kalan insülin yıkımının en büyük kısmı böbrekte gerçekleşir (68).

## 2.7. İNSÜLİN DİRENCİ

İnsülin direnci, başta karaciğer, yağ, kas dokusunda ve insüline bağımlı diğer hedef dokularda insülin hormonuna karşı biyolojik yanıtın bozulmasıdır (69).

İnsülin direnci kandan glikozun uzaklaştırılmasının azalmasına neden olur. Aynı zamanda yüksek glikoz düzeyini düşürmek ve kan glikozunun normal düzeyini koruyabilmek için pankreas  $\beta$ -hücrelerinden daha fazla insülin salgılanmasıyla sonuçlanır. İnsülinin anabolik bir hormon olması sebebiyle yüksek insülin seviyesi kilo alımına sebep olur ve kilo artışı insülin direncini şiddetlendirir. Yağ dokusundaki insülin direnci, lipolizin baskılanamaması ve serbest yağ asitlerinin dolaşımında artmasına sebep olur. Kas dokusunun glikoz yıkımının birincil yeridir ve kalori alımı sonrasında dolaşımdaki glikozun yaklaşık %70'ini kullanır. İnsülin direnci gelişen kas dokusu yeterince glikozu alamaz ve fazla glikoz karaciğere geri döner, de-novo lipogenezi tetikleyerek trigliserit ve serbest yağ asitlerini artırır. Tüm bu sonuçlar yağ dokusunun artması ve insülin direncinin daha da şiddetlenmesiyle sonuçlanır (69).

İnsülin direncinin öncelikli sebebi vücut yağının aşırı artmasıdır. Modern hayatın getirdiği dengesiz beslenme, hareketsiz yaşam, glikoz toksisitesi, lipotoksiste, bazı ilaçlar ve bazı eksojen insülinler gibi sebeplerin yanında genetik sebepleri de olabilir (69,70). İnsülin direncine sebep olan bir diğer etmen kronik inflamasyondur (71,72). Başka hormonlar ve sinyaller de insülinin etkisini azaltabilir (46,72).

İnsülin direncinin patofizyolojisine bakıldığında altta yatan pek çok moleküler mekanizma olabileceği görülmüştür ve kesin sebebi belirsizdir. İnsülin sinyal iletimindeki bozulmaların belirgin rol oynadığı görülmüştür (73). Türkiye Diyabet Vakfı, 2017 yılında düzenlenen İnsülin Direnci Çalıştayı Raporu'nda insülin direncinin moleküler mekanizmalarını üç başlıkta açıklamıştır. Bunlardan birincisi prereseptör bozukluklardır; insülin antikorumları, insülin molekülünde polimorfizm ve mutant insülin durumlarını kapsar. İkincisi insülin reseptör bozukluklarıdır; reseptör mutasyonu ve reseptöre karşı antikor sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Üçüncüsü postreseptör

bozukluklardır. Bunlar; sinyal ileti sistemindeki defektler (İnsülin Reseptör Substrat fosforilasyon bozuklukları, proinflamatuvar sitokinler gibi), glikoz taşıyıcısı GLUT4 mutasyonları ve diğer sebepler olarak rapor edilmiştir (74).

İnsülin direncinin hiperglisemi, hiperürisemi, hipertansiyon, ateroskleroz, visseral adiposite dislipidemi, inflamatuvar belirteçlerin yükselmesi gibi metabolik sonuçları olabileceği gibi ilerlemesiyle metabolik sendrom, tip 2 diyabet ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı gibi hastalıklara yol açabilir. İnsülin direncinde en baskın görülen sonuç tip 2 diyabettir. Tip 2 diyabet gelişen hastalarda insülin direncinin yaklaşık 10-15 yıl öncesinde başladığı düşünülmektedir (69,70).

İnsülin direnci Amerika Birleşik Devletlerinde 20 yaş ve üzeri yetişkinlerin %24'ünü etkilemektedir. Amerika Birleşik Devletleri gibi obezite ve ona eşlik eden hastalıkların arttığı ülkelerde, insülin direncinin sebep olduğu hastalıkların tedavisi sağlık sistemi harcamalarına ciddi miktarda yük bindirmektedir (69). Ülkemizde de diyabet ve insülin direnci görülme sıklığı bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Türkiye'nin 7 bölgesini de kapsayacak şekilde 3331 katılımcıyla 2017 yılında gerçekleştirilen çalışmada insülin direnci prevalansının %26,2 olduğu bulunmuştur (75).

İnsülin direnci tedavisinin ilk hedefi insülin duyarlılığını artırmaktır. Fiziksel aktivitenin artırılması ve kilo kaybı insülin duyarlılığını artırmaktadır. Bunun için bireyler beslenme alışkanlıklarını ve yaşam tarzını değiştirmelidir. Kalori kısıtlaması yapılmalı, insülin talebini artıran basit karbonhidrat kaynakları azaltılmalı, onun yerine yüksek posalı besinler seçilmelidir (69,76).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. ETİK KURUL ONAYI VE DESTEK ALINAN KURULUŞ**

Bu proje Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulunun (HADYEK) 2022/1-3 karar numaralı onayı ile gerçekleştirilmiştir (Ek-1). Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce desteklenmiştir. (Proje Numarası: 2021/091).

#### **3.2. ÇALIŞMADA BULUNAN ARAŞTIRMACILAR**

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Ayşe Şeyma Çoban'ın tez projesidir.

Yürütücülüğünü Prof. Dr. Fatih Gültekin'in yaptığı projede ayrıca; Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Saliha Uysal, Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden sorumlu Vet. Hek. Mustafa Hilmi Yaranoglu ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Biyoistatistik ve Biyoinformatik Uygulama ve Araştırma Merkezi (UAM) müdür yardımcısı Öğr. Gör. Kürşad Nuri Baydili bulunmaktadır.

#### **3.3. ÇALIŞMANIN TÜRÜ**

Çalışma prospektif randomize plasebo kontrollü *in vivo* çalışmadır.

#### **3.4. ÇALIŞMANIN YERİ**

Araştırmanın deneysel aşaması Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütülmüştür. Hayvanlar buradan temin edilmiştir ve deneysel çalışmanın tüm aşamaları sırasında burada barındırılmıştır. Avrupa Konseyi'nin önerdiği standartlar doğrultusunda “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik” (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) (ETS 123) dikkate alınmış ve deney bu standartlara uyularak gerçekleştirilmiştir.

Araştırmanın Laboratuvar aşamaları sırasıyla; kan numunelerinin santrifüje edilmesi ve ependorf tüplerine ayrılması Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) testleri Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Laboratuvarında, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Gas Chromatography–Mass Spectrometry = GC-MS) analizi ise Sem Laboratuvar Cihazları Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş.’nin İstanbul laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

### **3.5. KULLANILAN GEREÇLER**

#### **3.5.1. Cihazlar ve Sarf Malzemeler**

- Hassas terazi (Kern, PFB 6000-1, Almanya)
- Anestezi Cihazı (Plexx, HNG 6, Hollanda)
- Santrifüj (Hettich, UNV.3202)
- -80 °C Derin Dondurucu (Haier, DW-86L628)
- Glukometre ve Test Stripleri (Roche, Accu-Chek Instant, Mannheim, Almanya)
- Analitik Terazi (Shimadzu, ATX224R, Japonya)
- Vorteks (IKA Vortex 4 Basic, Amerika)
- İnkübatör (Grant, Thermo-Shaker PHMP, İngiltere)
- ELISA Plate Yıkayıcı (BioTek, ELx50, Amerika)
- Mikroplaka Okuyucu (Thermo Scientific, Varioskan Flash, Vantaa, Finlandiya)
- GC-MS (Agilent 8890-5977B GC-MSD)
- Sarı Kapaklı Jelli Biyokima Tüpü (Vacusera, Disera, İzmir, Türkiye)
- Gavaj iğnesi (16 Gauge)

#### **3.5.2. Laboratuvar Ölçüm Kitleri**

- Rat Insulin ELISA Kit; Catalog No: E0707Ra; Bioassay Technology Laboratory, Nanhu Dist, Jiaxing, Zhejiang, China

- Rat Glukagon ELISA Kit; Catolog No: E1066Ra; Bioassay Technology Laboratory, Nanhu Dist, Jiaxing, Zhejiang, China
- Rat fatty acid binding protein ELISA Kit; Catolog No: E0760Ra; Bioassay Technology Laboratory, Nanhu Dist, Jiaxing, Zhejiang, China
- Jasem Short Chain Fatty Acids GC-MS Analysis Kit

### 3.5.3. Kimyasallar

- Calcium propionate,  $\geq 97.0$  % (dry substance, NT) CAS No: 4075-81-4 (21230, Sigma Aldrich, Almanya)

### 3.5.4. İstatistik Programları

- IBM SPSS 25 paket programı

## 3.6. GÜÇ ANALİZİ VE ÖRNEKLEM SEÇİMİ

Araştırmada örnekleme dahil edilmesi gereken sıçan sayısı Tirosh ve ark. (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın verileri kullanılarak hesaplanmıştır (5). Hesaplamalar sonucunda 0,81 düzeyinde bir güç için, her bir grupta 11 olmak üzere toplamda 33 sıçanın örnekleme dahil edilmesi gerektiği tespit edilmiştir ( $\mu_1 = 1,09$ ;  $\mu_2 = 2,04$ ;  $\sigma_1 = 0,38$ ;  $\sigma_2 = 0,95$ ;  $\alpha = 0,05$ ;  $R = 1$ ).

Çalışma öncesinde hayvanlar tartılmış olup (Kern, PFB 6000-1), 280-345 g aralığındaki hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Sıçanların deney gruplarına ağırlıklarına göre eşit aralıkta dağıtılabilmesi için; ağırlıkları 280-300 g, 301-320 g ve 321-345 g olacak şekilde üçe ayrılmış ve her aralıktan birer hayvan seçilerek Kontrol (K), Propiyonat Düşük Doz (PD) ve Propiyonat Yüksek Doz (PY) gruplarına dağıtımları yapılmıştır. Sıçanların her gruptaki canlı ağırlıkları ortalama  $315 \pm 30$  g olmuştur.

Her gruptaki 11 sıçan için  $n=6$  ve  $n=5$  olmak üzere iki kafes kullanılmıştır. Sıçanları birbirinden ayırt etmek ve takiplerini yapmak için tüm kafeslerdeki sıçanların kuyruklarına 1'den 6'ya ve 1'den 5'e kadar çizgi çekilmiştir. Çizgi silinmeye başladıkça üzerinden tekrar geçilerek izlerin kaybolması önlenmiştir.

## 3.7. DENEYSEL YÖNTEM VE ÇALIŞMA PLANI

### 3.7.1. Deneyin Başlangıcı

Hayvanlar, “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik” (ETS 123) kapsamında hayvan başına minimum 300 cm<sup>2</sup> taban alanına sahip olacak şekilde standart sıçan kafeslerinde ve deney süresince standart yem (*ad libitum*) ve çeşme suyu ile beslenerek, sıcaklığı (ort. 22 °C) ve bağıl nemi (ort. %50) sabit, 12 saat gece, 12 saat gündüz aydınlatmalı odalarda barındırılmıştır.

Sıçanlar 11 haftalıkken çalışmaya başlanmıştır. Sıçanların ilk haftalık ağırlık ölçümleri yapıldıktan sonra kan alma işlemine geçilmiştir. Çalışma başında 0. gün tüm sıçanların, inhalasyon yoluyla %2’lik izofluran anestezisi altında (Plexx, HNG 6) jugular veninden ortalama 2 ml kan alınmıştır. Anestezi derinliği, sıçanların parmak kısırtma yanıtlarına bakılarak takip edilmiştir. İzofluran kullanılmasının sebebi Ketamin-Ksilazin anestezisinin insülin konsantrasyonunu azaltması ve bu yüzden sonuçları yanıltma olasılığıdır. İzofluran ve Ketamin-Ksilazin anestezisinin insülin salınımına etkisinin kıyaslandığı bir çalışmada Ketamin-Ksilazin’in insülin konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (77).

0. gün alınan kanlar sarı kapaklı jelli biyokimya tüpüne (Vacusera, Disera, Türkiye) alınmıştır ve tüpün içerisindeki silika ile temas etmesi için birkaç kez alt üst edilmiştir. 30 dakika kanın pıhtılaşması beklenmiştir. 1700 g’de 15 dakika santrifüj edilerek (Hettich, UNV.3202) serumları ayrılmıştır. Serumlar çalışılacak parametrelere uygun olacak şekilde ependorf tüplerine porsiyonlanıp analizlerin yapılacağı güne kadar saklanmak üzere -80°C’de (Haier, DW-86L628) muhafaza edilmiştir.

Tartım ve kan alma işleminden bir gün sonra tüm sıçanların kuyruklarından lancet yardımıyla delme işlemi yapılarak test stripleri ve glukometre cihazı (Roche, Accu-Chek Instant) ile kan şekeri ölçümü yapılmıştır. Kan alma işlemi sırasında sıçanlar strese girebileceğinden ölçüm hatası riskine karşı kan şekeri ölçümü ve deneysel süreç bir gün sonra başlatılmıştır. Aynı gün gavaj yapılmaya başlanarak deneysel süreç başlatılmıştır.

### 3.7.2. Deney Süreci ve Yapılan İşlemler

Çalışmada bir gıda katkı maddesi olan kalsiyum propiyonat (E282) (Sigma Aldrich, 21230) kullanılmıştır. Kalsiyum propiyonat ( $\geq$ %97 kuru madde) 8 hafta boyunca her gün su içerisinde çözülürülerek oral gavaj yoluyla sıçanlara verilmiştir (Şekil 3.1). Bu yüzden suda çözünebilir formu kullanılmıştır. Kullanılan kalsiyum propiyonatın sudaki çözünürlüğü 1g/10ml'dir. Kullanılan gavaj iğnesi 16 gauge (G) iğnedir. Kalsiyum propiyonat ile çalışılırken maske, siperlik ve eldiven kullanılması gibi güvenlik önlemlerine uyulmuştur. (Sigma Aldrich CAS No: 4075-81-4 Calcium propionate Safety Data Sheet - SDS)



**Şekil 3.1:** Sıçanlara uygulanan oral gavaj işlemi

Sıçanlara verilecek miktarı belirlemek için önce işlenmiş gıdaları içeren bir diyetle beslenen insanların günlük olarak maruz kaldıkları propiyonik asit miktarı belirlenmiştir. Bu da 15 mg/kg canlı ağırlık/gün'e tekabül etmektedir (5). PD grubundaki hayvanlara bu dozda uyulama yapılmıştır. PY grubunun doz ayarlamasında ise sıçanlara özgü NOAEL (deney hayvanlarında gözlemlenebilen hiçbir yan etki gözlemlenmeyen doz) değeri olan 300 mg/kg canlı ağırlık/gün kullanılmıştır (6). Kontrol grubuna, gavaj işleminin stresini diğer gruplarla eşit bir şekilde yaşamaları için su ile gavaj yapılmıştır.

Çalışma boyunca her hafta başında gavaj işleminden önce kan şekeri ve ağırlık ölçümü yapılmıştır. 8 hafta boyunca her gün saat 10.00-12.00 arasında günde 1 kez gavaj yapılmıştır. Kalsiyum propiyonat çözeltisi her gün taze hazırlanmıştır. Gavaj yapılacak çözeltiler hazırlanırken 0,1 mg hassasiyette analitik terazi (Shimadzu, ATX224R) kullanılmıştır.

Her hayvanın ağırlığına göre alması gereken kalsiyum propiyonat dozunu içeren çözelti mililitresi farklı olacağından her sıçanın ağırlığı için miktar hesaplanarak gavaj yapılmıştır. Düşük ve yüksek doz grupları için ayrı ayrı eşit konsantrasyonda, günlük olarak gruptaki tüm sıçanlara yetecek miktarda çözelti hazırlanmıştır. Gavaj işlemi, sıçanların mide hacmi de düşünülerek 2,5 ml'lik enjektörle yapılacağı için çözelti konsantrasyonları 2 ml su üzerinden hesaplanmıştır. Propiyonat Düşük Doz (PD) grubu için 5 mg/ 2 ml'lik konsantrasyonda 26 ml çözelti, Propiyonat Yüksek Doz (PY) grubu için ise 100 mg / 2 ml'lik konsantrasyonda 26 ml çözelti hazırlanmıştır. 2 grup arasında doz miktarı bakımından 20 kat fark vardır (15 mg/kg – 300 mg/kg). Bu sebeple hazırlanan çözeltilerde de 20 katlık bir konsantrasyon farkı bulunması her sıçan için ayrı bir doz-kg hesabı yapmamak adına kolaylaştırıcı olmuştur.

Propiyonat Düşük doz (PD) grubu – 15 mg/kg için;

$$\frac{\text{Sıçan Ağırlığı (g)} \times 15 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = D \text{ mg Kalsiyum Propiyonat}$$

5 mg/2 ml'lik bir Kalsiyum Propiyonat çözeltisinden sıçan ağırlığına uygun olan D mg kalsiyum propiyonata karşılık gelen çözelti mililitresi için;

$$\begin{array}{ccc} 2 \text{ ml} & \searrow \nearrow & 5 \text{ mg} \\ X \text{ ml} & & D \text{ mg} \end{array}$$

$$\frac{D \text{ mg Kalsiyum Propiyonat} \times 2 \text{ ml}}{5 \text{ mg}} = X \text{ ml}$$

PD grubu gibi PY grubunda da aynı hesaplama yapılmıştır. Verilmek istenen dozlar arasında (15-300 mg/kg) ve iki grup için hazırlanan çözelti konsantrasyonları arasında (5-100 mg/ml) 20 kat fark olması sebebiyle ağırlığa göre verilecek doz miktarları

PD ve PY grupları için eşit çıkmıştır. PD ve PY gruplarına yukarıdaki hesaplamalara göre hazırlanan Tablo 3.1'deki miktarlara bakılarak ağırlıklarına özgü kalsiyum propiyonat çözeltisi verilmiştir. Kontrol grubuna ise başlangıçta 1,8 ml su verilmiştir ve her hafta 0,1 ml artırılarak devam edilmiştir.

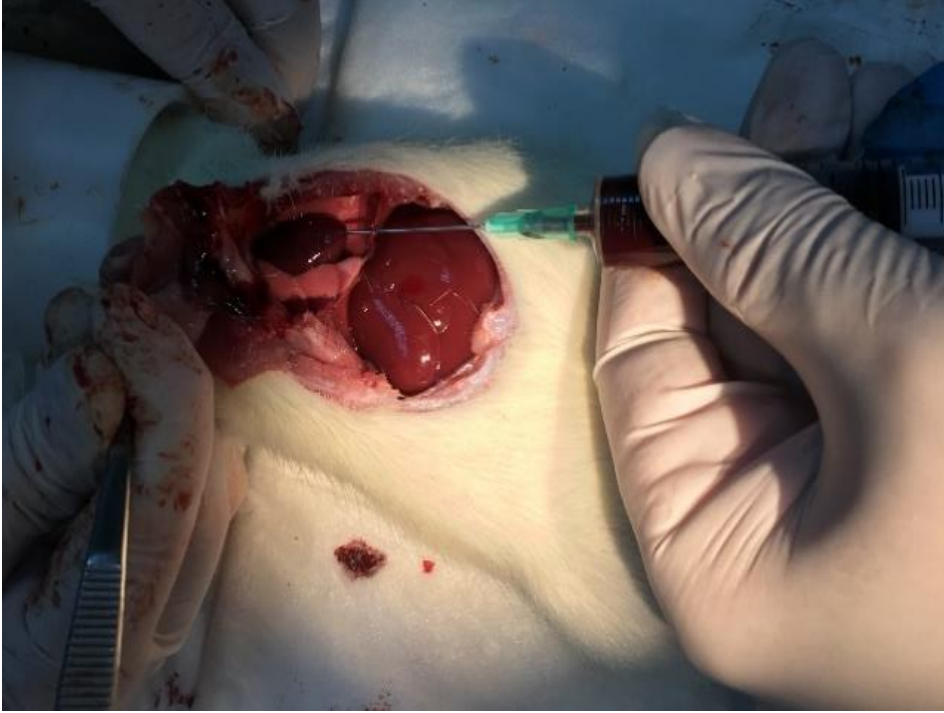
**Tablo 3.1:** Sıçanların ağırlıklarına göre alması gereken ml cinsinden çözelti miktarları tablosu

Gavaj için doza göre ayarlanmış ml cinsinden çözelti miktarları											
	PD	PY		PD	PY		PD	PY		PD	PY
Ağırlık	5mg/ 2ml	100mg/ 2ml	Ağırlık	5mg/ 2ml	100mg/ 2ml	Ağırlık	5mg/ 2ml	100mg/ 2ml	Ağırlık	5mg/ 2ml	100mg/ 2ml
280	1,68	1,68	318	1,908	1,908	356	2,136	2,136	394	2,364	2,364
281	1,686	1,686	319	1,914	1,914	357	2,142	2,142	395	2,37	2,37
282	1,692	1,692	320	1,92	1,92	358	2,148	2,148	396	2,376	2,376
283	1,698	1,698	321	1,926	1,926	359	2,154	2,154	397	2,382	2,382
284	1,704	1,704	322	1,932	1,932	360	2,16	2,16	398	2,388	2,388
285	1,71	1,71	323	1,938	1,938	361	2,166	2,166	399	2,394	2,394
286	1,716	1,716	324	1,944	1,944	362	2,172	2,172	400	2,4	2,4
287	1,722	1,722	325	1,95	1,95	363	2,178	2,178	401	2,406	2,406
288	1,728	1,728	326	1,956	1,956	364	2,184	2,184	402	2,412	2,412
289	1,734	1,734	327	1,962	1,962	365	2,19	2,19	403	2,418	2,418
290	1,74	1,74	328	1,968	1,968	366	2,196	2,196	404	2,424	2,424
291	1,746	1,746	329	1,974	1,974	367	2,202	2,202	405	2,43	2,43
292	1,752	1,752	330	1,98	1,98	368	2,208	2,208	406	2,436	2,436
293	1,758	1,758	331	1,986	1,986	369	2,214	2,214	407	2,442	2,442
294	1,764	1,764	332	1,992	1,992	370	2,22	2,22	408	2,448	2,448
295	1,77	1,77	333	1,998	1,998	371	2,226	2,226	409	2,454	2,454
296	1,776	1,776	334	2,004	2,004	372	2,232	2,232	410	2,46	2,46
297	1,782	1,782	335	2,01	2,01	373	2,238	2,238	411	2,466	2,466
298	1,788	1,788	336	2,016	2,016	374	2,244	2,244	412	2,472	2,472
299	1,794	1,794	337	2,022	2,022	375	2,25	2,25	413	2,478	2,478
300	1,8	1,8	338	2,028	2,028	376	2,256	2,256	414	2,484	2,484
301	1,806	1,806	339	2,034	2,034	377	2,262	2,262	415	2,49	2,49
302	1,812	1,812	340	2,04	2,04	378	2,268	2,268	416	2,496	2,496
303	1,818	1,818	341	2,046	2,046	379	2,274	2,274	417	2,502	2,502
304	1,824	1,824	342	2,052	2,052	380	2,28	2,28	418	2,508	2,508
305	1,83	1,83	343	2,058	2,058	381	2,286	2,286	419	2,514	2,514
306	1,836	1,836	344	2,064	2,064	382	2,292	2,292	420	2,52	2,52
307	1,842	1,842	345	2,07	2,07	383	2,298	2,298	421	2,526	2,526
308	1,848	1,848	346	2,076	2,076	384	2,304	2,304	422	2,532	2,532
309	1,854	1,854	347	2,082	2,082	385	2,31	2,31	423	2,538	2,538
310	1,86	1,86	348	2,088	2,088	386	2,316	2,316	424	2,544	2,544
311	1,866	1,866	349	2,094	2,094	387	2,322	2,322	425	2,55	2,55
312	1,872	1,872	350	2,1	2,1	388	2,328	2,328	426	2,556	2,556
313	1,878	1,878	351	2,106	2,106	389	2,334	2,334	427	2,562	2,562
314	1,884	1,884	352	2,112	2,112	390	2,34	2,34	428	2,568	2,568
315	1,89	1,89	353	2,118	2,118	391	2,346	2,346	429	2,574	2,574
316	1,896	1,896	354	2,124	2,124	392	2,352	2,352	430	2,58	2,58
317	1,902	1,902	355	2,13	2,13	393	2,358	2,358	431	2,586	2,586

PD: Propiyonat Düşük Doz, PY: Propiyonat Yüksek Doz

### 3.7.3. Deneyin Sonlandırılması

8. haftanın sonunda son kez ağırlık ve kan şekeri ölçümleri yapılmıştır ve deney sonlandırma aşamasına geçilmiştir. Çalışma sonunda inhalasyon yoluyla %2'lik izofluran anestezisi altında (Plexx, HNG 6, Hollanda) sıçanların intrakardiyak kanları alınmıştır (Şekil 3.2). Sakrifikasyon işlemi kanlar alındıktan sonra anestezisi altında servikal dislokasyon metodu ile gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.2:** Sıçanlardan kardiyak kan alma işlemi

Çalışma sonunda alınan kanlar 0. gün alınan kanlar gibi sarı kapaklı jelli biyokimya tüpüne alınmıştır ve tüpün içerisindeki silika ile temas etmesi için birkaç kez alt üst edilmiştir. 30 dakika kanın pıhtılaşması beklenmiştir. Ardından 1700 g'de 15 dakika santrifüj edilerek (Hettich, UNV.3202) serumları ayrılmıştır. Serumlar ependorf tüplerine porsiyonlanıp 0. Gün kanlarıyla beraber analizlerin yapılacağı güne kadar -80°'de (Haier, DW-86L628) saklanmıştır.

### 3.8. LABORATUVAR ANALİZLERİ

Tüm analizler için serumlar, analizlerin yapılacağı zaman kademeli olarak oda sıcaklığına getirilmiştir (-80° → -20° → 2-8° → oda sıcaklığı).

#### 3.8.1. ELISA Testleri

Çalışmada kullanılan ELISA kitlerinin çalışma prensibi Sandwich ELISA'dır.

Çalışma prosedürü;

1. Tüm reaktifler oda sıcaklığına gelince standart stok solüsyonu hazırlanır.
2. Kalibratörleri oluşturmak için 200 µl standart stok solüsyonu 200 µl standart seyreltici ile karıştırılıp 15 dk beklenir.
3. 15 dakikanın sonunda karışım, içinde 200'er µl standart dilüent bulunan ependorf tüplerine her seferinde vortekslenip seri dilüsyon yapılarak 5 adet kalibratör hazırlanır.
4. Sadece standart dilüent içeren kör hazırlanır ve bakılacak parametreye özgü primer antikorla kaplı kuyucukların olduğu mikroelisa plakasına uygun yerlere sırasıyla 50 µl olacak şekilde standart eklenir.
5. Numune kuyucuklarına 40 µl numune eklendikten sonra kör kontrol kuyusu ve kalibratörler hariç tüm kuyulara 10 µl sekonder antikor eklenir.
6. Ardından kör kontrol kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara Streptavidin – Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi eklenir.
7. Plaka bir kapatıcı ile örtülüp 37°C'de 60 dakika inkübe edilir (Grant, Thermo-Shaker PHMP).
8. İnkübasyondan sonra kapatıcı çıkarılıp plaka 5 kez yıkanır (BioTek, ELx50).
9. Her bir kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklenir ve ardından her kuyucuğa substrat solüsyonu B eklenir.
10. Yeni bir kapatıcı ile üzeri kaplanıp karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edilir.
11. İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenir ve substrat eklendikten sonra plakada oluşan mavi renk (Şekil 3.3), durdurma solüsyonunun da eklenmesiyle sarı bir görüntü kazanır (Şekil 3.4).

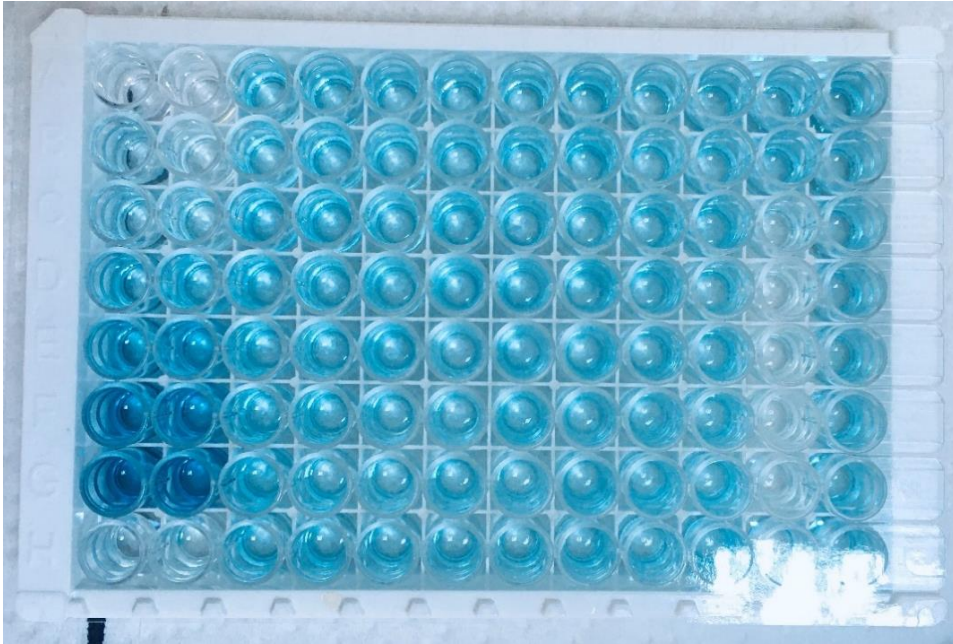
12. Durdurma solüsyonu eklendikten sonraki 10 dakika içerisinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu (Thermo Scientific, Varioskan Flash) kullanılarak her kuyunun optik yoğunluğu belirlenir.

#### 3.8.1.1. İnsülin Ölçümü:

İnsülin analizi için ölçüm aralığı 0,1-40mIU/L ve hassasiyeti 0,05mIU/L olan sıçan ELISA kiti kullanılmıştır (Rat Insulin ELISA Kit; Catalog No: E0707Ra; from Bioassay Technology Laboratory, Nanhu Dist, Jiaxing, Zhejiang, China).

#### 3.8.1.2. Glukagon Ölçümü:

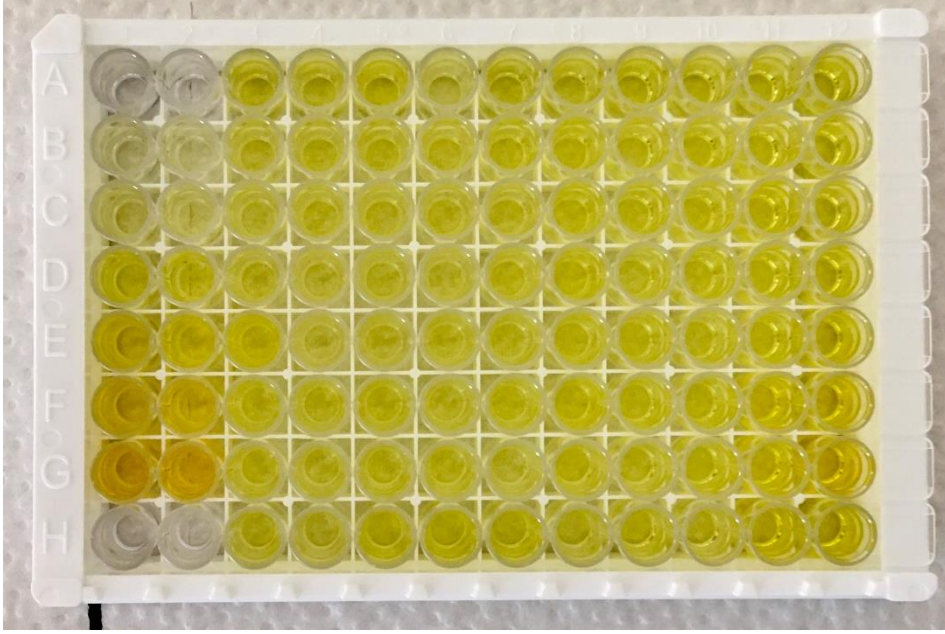
Glukagon analizi için ölçüm aralığı 5-1000ng/L ve hassasiyeti 2,53 ng/L olan sıçan ELISA kiti kullanılmıştır (Rat Glukagon ELISA Kit; Catalog No: E1066Ra; from Bioassay Technology Laboratory, Nanhu Dist, Jiaxing, Zhejiang, China).



**Şekil 3.3:** Glukagon ELISA plakasının durdurma solüsyonu eklenmeden önceki görüntüsü

### 3.8.1.3. Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 4 (FABP4) Ölçümü:

FABP4 analizi için ölçüm aralığı 0,05-30 ng/ml ve hassasiyeti 0,026 ng/ml olan sıçan ELISA kiti kullanılmıştır (Rat fatty acid binding protein ELISA Kit; Catalog No: E0760Ra; from Bioassay Technology Laboratory, Nanhu Dist, Jiaxing, Zhejiang, China).



Şekil 3.4: FABP4 ELISA plakasının durdurma solüsyonu eklendikten sonraki görüntüsü

### 3.8.2. GC-MS Yöntemi ile Kalsiyum Propiyonat Ölçümü

Sıçan serumundan trimetilsilil (-TMS) esterleşme reaksiyonu baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Analizde propiyonik asit değerleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum numune hazırlık prosedürü ile propiyonik asit, sıçan serumu numunesinden ekstraksiyon işlemi ile alınarak esterleşme işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada esterleşme reaksiyonu Jasem Short Chain Fatty Acids GC-MS Analysis Kit reaktifleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### Numune Hazırlık Prosedürü

1. Sıçan serumu örneklerinden 200 µl mikro santrifüj tüplerine alınmıştır.
2. Her bir numunenin üzerine 20 µl propiyonik asit iç standardı (Propiyonik asit-d5) eklenmiştir.

3. Üzerine 10 µl Jasem Short Chain Fatty Acids Analysis Kit Reagent-1 eklenerek 20 sn vortexlenmiştir.

4. 600 µl Jasem Short Chain Fatty Acids Analysis Kit Reagent-2 ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 3500 rpm'de 5 dk santirüj edilerek üst faz temiz bir HPLC vialine alınmıştır.

5. Türevlendirme için 10 µl Jasem Short Chain Fatty Acids Analysis Kit Reagent-3 eklenerek HPLC vialinin kapağı sıkıca kapatılarak 60 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

6. Türevlendirme reaksiyonu sonrası numuneler oda koşullarına geldiğinde GC-MS cihazına verilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi propiyonik asit standardı ve iç standardı kullanılarak oluşturulmuştur.

7 seviyeli kalibratör noktası saf standart ile hazırlanmıştır.

Konsantrasyon aralığı: 2,5-1000 µM

GC-MS: Agilent 8890-5977B GC-MSD

Analitik Kolon: HP-5MS 30 m x 250 µm x 0.25 µm

Taşıyıcı Gaz: %99 Helyum

### **3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Verilerin analizi IBM SPSS 25 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Nicel değişkenler için aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri sunulmuştur. İki tekrarlı ölçümlerin karşılaştırılmasında eşleştirilmiş örneklem t testi (paired sample t-test) kullanılmış, gruplar arasında tekrarlı ölçümlerdeki değişimler bakımından incelemeler tekrarlı ölçümler için ANOVA ile incelenmiştir. Gruplar arasında ölçüm değerleri bakımından karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Araştırmada tip I hata oranı 0,05 olarak alınmıştır.

### **3.10. ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Bu çalışmada araştırmacılar arasında çıkar çatışması yoktur.

### 3.11. ARAŞTIRMANIN KISITLILIKLARI

İnsan metabolizması ve sıçan metabolizması her ne kadar benzerlikler taşısa da birbirinden farklıdır. Araştırmada sıçanlarla çalışılmış olması, kalsiyum propiyonatın insanlar üzerinde de aynı etkiye yol açıp açmayacağını kesin olarak ortaya koyamayacağı için bu araştırmanın kısıtlılığıdır.

Bu çalışmada sıçanlara 8 hafta uygulama yapılmıştır. Ancak bu sürenin propiyonik asitin kronik etkisinin gözlenebilmesi için yeterli gelip gelmeyeceğı belirsizdir. Ayrıca sıçanlar normal ağırlık artışının devam ettiğı gelişme dönemindeyken çalışılmıştır. Ve bu durum propiyonik asit etkeninin ve diğere parametrelerin ağırlık artışı ile ilişkilendirilememesine sebep olmuştur.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DENEY HAYVANLARININ ÖZELLİKLERİ

Çalışmada kullanılan sıçanlara ait özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1:** Sıçanlara ilişkin temel betimsel bulgular

	Hayvan Türü ve Irkı	Sayısı (Adet)	0. Gün Vücut Ağırlığı (Ortalama/Min-Max) (g)	8. Hafta Vücut Ağırlığı (Ortalama/Min-Max) (g)
<b>Kontrol</b>	Sıçan / Wistar Albino	11	313,7 / (281 – 345)	372,6 / (340 – 431)
<b>PD</b>	Sıçan / Wistar Albino	11	321 / (306 – 335)	378 / (347 – 407)
<b>PY</b>	Sıçan / Wistar Albino	11	312,9 / (293 – 335)	362,1 / (330 – 384)

PD: Propiyonat Düşük Doz  
PY: Propiyonat Yüksek Doz

### 4.2. DAĞILIMIN NORMALLİĞİ

Araştırmada dağılımın normalliğini tespit etmek üzere ve Shapiro-Wilk testleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre FABP4, glikoz ve insülinin ilk ölçümlerinde normal dağılımın sağlanmadığı tespit edilmiş ve dağılımın normalliğini sağlamak üzere bu üç ölçüm için uç değer tespiti yapılarak belirlenen değerler çalışma dışı bırakılmıştır. Normallik testi bu değerlerin tespit edilip çalışma dışı bırakılmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Ölçülen tüm parametrelerde dağılım normal çıktığı için parametrik testlerin yapılması uygun bulunmuştur.

### 4.3. GRUPLARIN KENDİ İÇİNDE TEKRARLI ÖLÇÜMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Grupların kendi içerisinde 0. gün ve 8. haftaya ait ölçümlerinin karşılaştırıldığı sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

**Tablo 4.2:** Grupların 0. gün ve 8. haftada propiyonik asit, insülin, glukagon, FABP4, glikoz düzeyleri ile ağırlık değişimlerinin karşılaştırılması

		KONTROL		PD		PY	
		Ortalama ± SD	P	Ortalama ± SD	P	Ortalama ± SD	P
<b>Propiyonik Asit (µM)</b>	0. gün	160 ± 32	0,158	83 ± 21	<b>0,004</b>	151 ± 47	0,277
	8. hafta	132 ± 46		157 ± 75		172 ± 36	
<b>İnsülin (mIU/L)</b>	0. gün	4,21 ± 0,61	<b>0,005</b>	4,11 ± 0,26	<b>&lt;0,001</b>	3,97 ± 0,75	<b>&lt;0,001</b>
	8. hafta	5,09 ± 0,72		5,11 ± 0,54		5,53 ± 0,43	
<b>Glukagon (ng/L)</b>	0. gün	168 ± 18	0,294	152 ± 14	0,197	149 ± 13	<b>0,032</b>
	8. hafta	160 ± 13		161 ± 10		165 ± 15	
<b>FABP4 (ng/ml)</b>	0. gün	4,53 ± 0,41	0,061	4,28 ± 0,59	<b>0,005</b>	4,63 ± 0,85	<b>0,022</b>
	8. hafta	5,08 ± 0,61		5,27 ± 0,50		5,44 ± 0,41	
<b>Glikoz (mg/dl)</b>	0. gün	103 ± 6	0,262	109 ± 13	<b>0,012</b>	106 ± 14	<b>0,006</b>
	8. hafta	100 ± 7		97 ± 6		92 ± 6	
<b>Ağırlık (g)</b>	0. gün	314 ± 19	<b>&lt;0,001</b>	321 ± 10	<b>&lt;0,001</b>	313 ± 13	<b>&lt;0,001</b>
	8. hafta	373 ± 25		378 ± 20		362 ± 15	

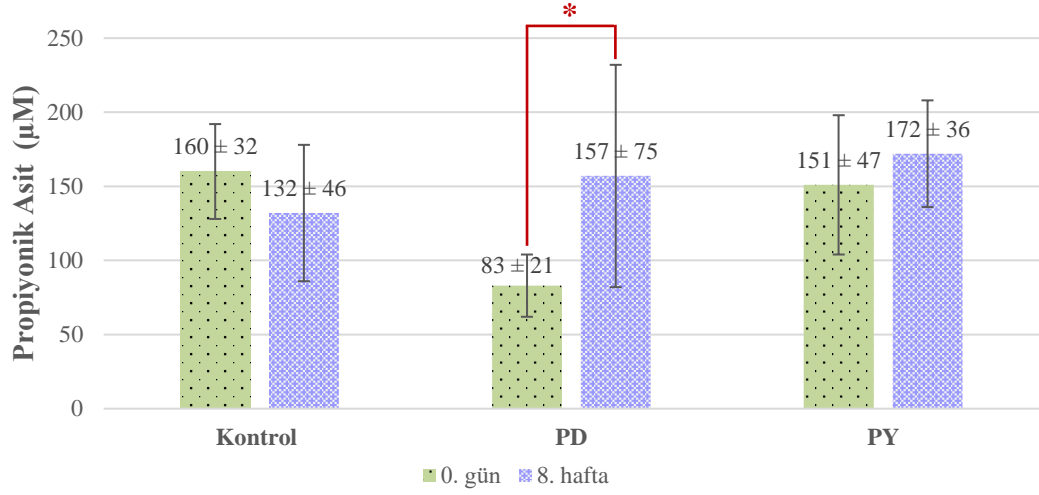
µM: mikromolar, ng: nanogram, ml: mililitre, mIU: miliinternationalunit, L: litre, mg: miligram, dl: desilitre g:gram

PD: Propiyonat Düşük Doz

PY: Propiyonat Yüksek Doz

P değerleri eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test) ile elde edilmiştir.

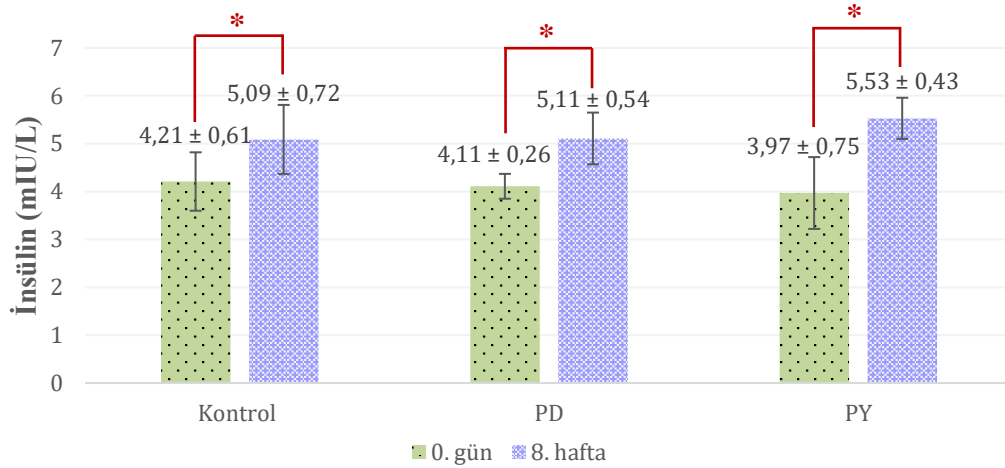
Tabloda görüldüğü üzere propiyonik asit değerinde Kontrol grubunda 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,158$ ). PD grubunda 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında propiyonik asit değerinde artış gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,004$ ). 8.hafta ölçümleri 0. gün ölçümlerinden daha yüksek bulunmuştur. PY grubunda 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında propiyonik asit değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,277$ ). Kontrol, PD ve PY gruplarında 0. gün ve 8. hafta propiyonik asit düzeyleri ortalama değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1:** 0. gün ve 8. hafta propiyonik asit düzeyi ortalamaları

\*: Karşılaştırıldığında anlamlı olan gruplar.  $P<0,05$  eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test)

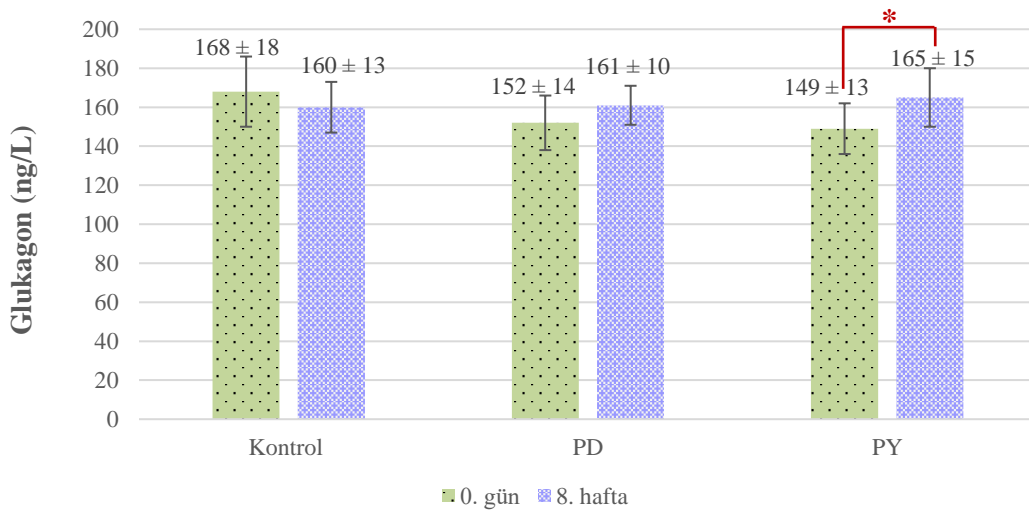
Kontrol grubunda insülin değeri için 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,005$ ). PD grubunda insülin değeri için 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde PY grubunda da insülin değeri için 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). Elde edilen sonuçlar üç grup için de 8. hafta insülin değerlerinin ölçümlerinin 0. gün ölçümlerinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Kontrol, PD ve PY gruplarında 0. gün ve 8. hafta insülin düzeyleri ortalama değerleri Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



**Şekil 4.2:** 0. gün ve 8. hafta insülin düzeyi ortalamaları

\*: Karşılaştırıldığında anlamlı olan gruplar.  $P < 0,05$  eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test)

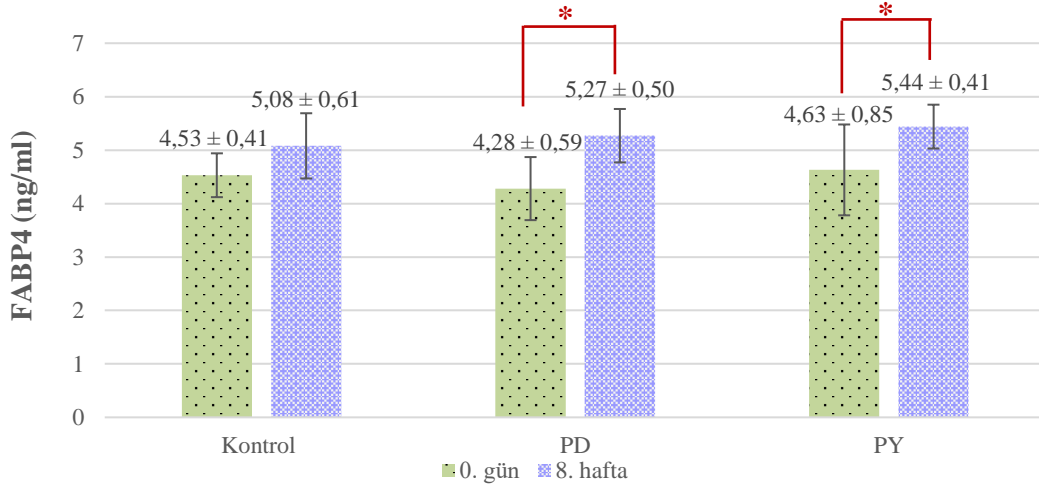
Glukagon parametresi için Kontrol grubunda 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p=0,294$ ). Benzer şekilde PD grubunda da 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p=0,197$ ). Ancak PY grubunda 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,032$ ). PY grubunda 8. hafta glukagon ölçümleri 0. gün ölçümlerinden daha yüksek bulunmuştur. Kontrol, PD ve PY gruplarında 0. gün ve 8. hafta glukagon düzeyleri ortalama değerleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.3:** 0. gün ve 8. hafta glukagon düzeyi ortalamaları

\*: Karşılaştırıldığında anlamlı olan gruplar.  $P < 0,05$  eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test)

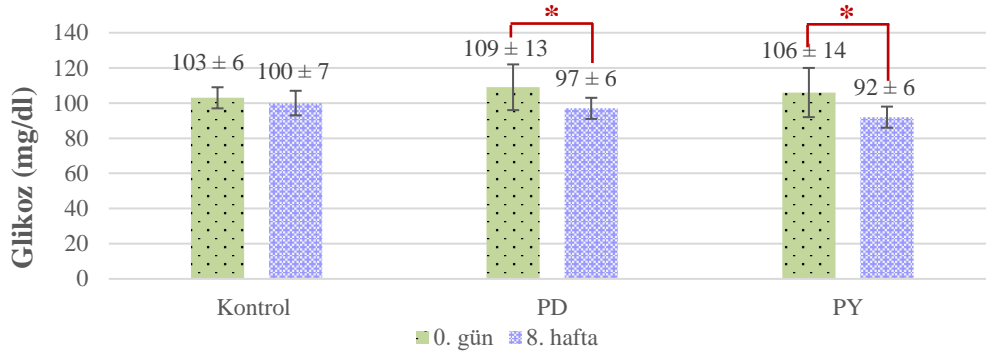
Kontrol grubunda FABP4 değeri için 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında fark yoktur ( $p=0,061$ ). PD grubunda FABP4 değerinde 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,005$ ), bu farklılık 8. Hafta ölçümlerinin daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. PY grubunda da FABP4 değerinde 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,022$ ). Benzer şekilde bu farklılık 8. hafta ölçümlerinin daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Kontrol, PD ve PY gruplarında 0. gün ve 8. hafta FABP4 düzeyleri ortalama değerleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.4:** 0. gün ve 8. hafta FABP4 düzeyi ortalamaları

\*: Karşılaştırıldığında anlamlı olan gruplar.  $P<0,05$  eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test)

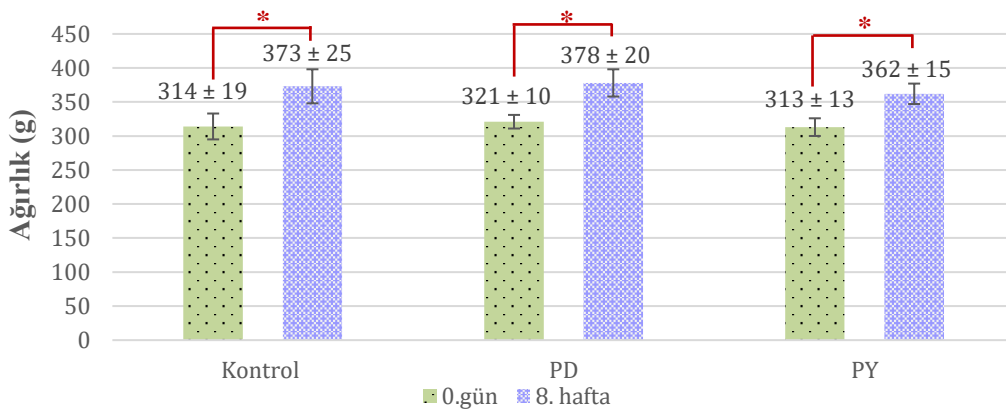
Kontrol grubunda glikoz değeri için 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,262$ ). PD grubunda 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,012$ ). PY grubunda da 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,006$ ). PD ve PY gruplarında glikoz değerlerinde 8 hafta ölçümlerinde azalış gözlenmiştir. Kontrol, PD ve PY gruplarında 0. gün ve 8. hafta glikoz düzeyleri ortalama değerleri Şekil 4.5’te gösterilmiştir.



**Şekil 4.5:** 0. gün ve 8. hafta glikoz düzeyi ortalamaları

\*: Karşılaştırıldığında anlamlı olan gruplar.  $P < 0,05$  eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test)

Kontrol grubunda 0. gün ve 8. hafta ağırlık ölçümleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Kontrol grubundaki bu farklılık 8. hafta ölçümlerinin 0. gün ölçümlerine göre yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. PD grubunda 0. gün ve 8. hafta ağırlık ölçümleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). PD grubundaki bu farklılık 8. hafta ölçümlerinin 0. gün ölçümlerine göre yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. PY grubunda 0. gün ve 8. hafta ağırlık ölçümleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). PY grubundaki bu farklılık diğer gruplarda olduğu gibi 8. hafta ölçümlerinin 0. gün ölçümlerine göre yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Ağırlık üç grupta da artış göstermiştir. Kontrol, PD ve PY gruplarında 0. gün ve 8. hafta ağırlık düzeyleri ortalama değerleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.6:** 0. gün ve 8. hafta ağırlık düzeyi ortalamaları

\*: Karşılaştırıldığında anlamlı olan gruplar.  $P < 0,05$  eşleştirilmiş örneklem t testi (paired samples t-test)

#### 4.4. GRUPLAR ARASINDA İLK VE SON ÖLÇÜMLERDEKİ DEĞİŞİMLER BAKIMINDAN KARŞILAŞTIRMALAR

Kontrol, PD ve PY grupları arasında 0. gün ve 8.hafta ölçümleri arasındaki değişimler bakımından incelemeler, “tekrarlı ölçümler için ANOVA” ile incelenmiştir. Gruplar arasında değişimler bakımından karşılaştırmasına Tablo 4.3’te yer verilmiştir.

**Tablo 4.3:** Gruplar arasında değişimler bakımından karşılaştırmalar

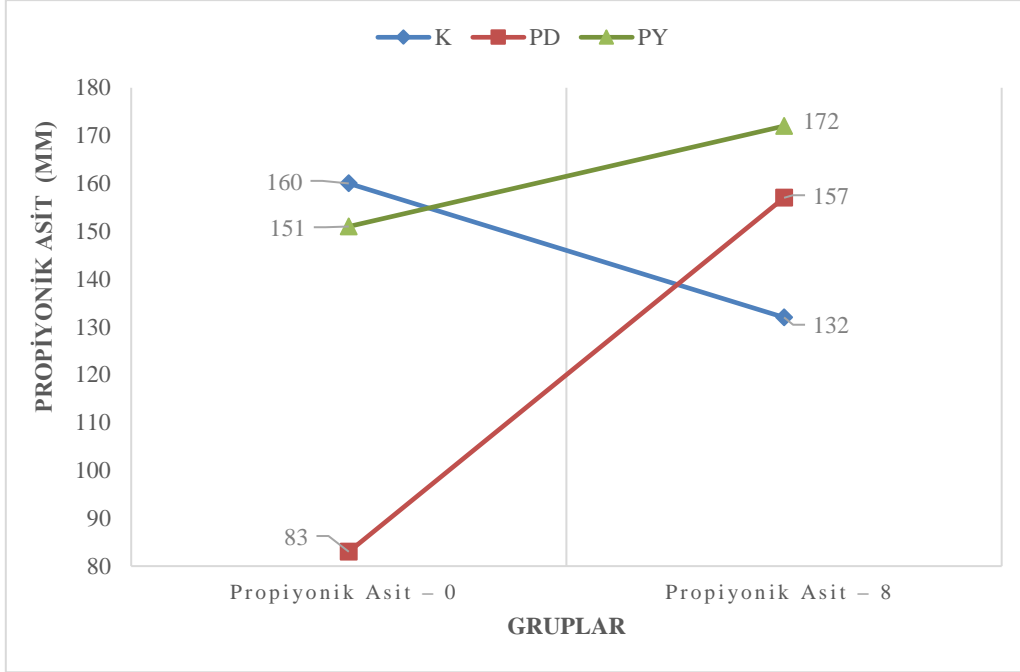
	Tip III Kareler Toplamı	Ortalama Kare	F	P	Farklılık
<b>Propiyonik Asit (µM)</b>	9664	4832	4,222	<b>0,024</b>	PD>PY>K
<b>İnsülin (mIU/L)</b>	0,145	0,072	0,42	0,662	-
<b>Glukagon (ng/L)</b>	379	189	2,702	0,083	-
<b>FABP4 (ng/ml)</b>	0,45	0,225	1,613	0,217	-
<b>Glikoz (mg/dl)</b>	89	44	0,779	0,468	-
<b>Ağırlık (g)</b>	793	396	1,544	0,230	-

µM: mikromolar, ng: nanogram, ml: mililitre, mIU: miliinternationalunit, L: litre, mg: miligram, dl: desilitre g:gram

Karşılaştırmalarda tekrarlı ölçümler için ANOVA testi kullanılmıştır.

Tablo 4.3’e göre Propiyonik asit parametresinin 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasındaki değişimi bakımından, Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (p=0,024). PD grubundaki 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasındaki değişim farkı PY grubunun 0. gün ve 8.hafta ölçümlerindeki değişiminden fazladır. PY grubundaki 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasındaki değişim farkı da Kontrol grubunun 0. gün ve 8.hafta ölçümlerindeki değişiminden fazladır.

Grupların 0. gün ve 8. hafta propiyonik asit ölçümleri farkı Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Sonuçlara göre; Kontrol grubunda 8. hafta ölçümlerinde 0. gün ölçümlerine göre azalış vardır, PD grubunda 8. hafta ölçümlerinde 0. gün ölçümlerine göre artış vardır, PY grubunda 8. hafta ölçümlerinde 0. gün ölçümlerine göre artış vardır.



**Şekil 4.7:** Grupların 0. gün ve 8. hafta propiyonik asit ölçümleri farkı

Tablo 4.3’te görüldüğü gibi FABP4, insülin, glukagon, glikoz ve ağırlık parametrelerinin 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasındaki değişimi bakımından, Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p değerleri sırasıyla; FABP4;  $p=0,217$ ; insülin:  $p=0,662$ ; glukagon:  $p=0,083$ ; glikoz:  $p=0,468$  ve ağırlık  $p=0,230$ ).

Propiyonik asit uygulaması FABP4, insülin, glukagon, glikoz ve ağırlık seviyelerinde değişikliğe sebep olmamıştır.

#### 4.5. GRUPLAR ARASINDA ÖLÇÜMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Kontrol, PD ve PY grupları arasında ölçüm değerleri bakımından karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Sonuçlara ilişkin bulgular Tablo 4.4'te sunulmuştur.

**Tablo 4.4:** Gruplar arasında ölçümlerin karşılaştırılması

	Kontrol	PD	PY	F	P	Farklılık
<b>Propiyonik Asit -0</b> ( $\mu$ M)	160,18 $\pm$ 31,73	83,36 $\pm$ 21,47	151,18 $\pm$ 47,09	15,794	<b>&lt;0,001</b>	PD<K,PY
<b>Propiyonik Asit -8</b> ( $\mu$ M)	131,55 $\pm$ 45,87	156,64 $\pm$ 74,8	171,82 $\pm$ 35,76	1,521	0,235	-
<b>İnsülin – 0</b> (mIU/L)	4,21 $\pm$ 0,61	4,11 $\pm$ 0,26	3,97 $\pm$ 0,75	0,373	0,692	-
<b>İnsülin – 8</b> (mIU/L)	5,09 $\pm$ 0,72	5,11 $\pm$ 0,54	5,53 $\pm$ 0,43	2,020	0,150	-
<b>Glukagon – 0</b> (ng/L)	168 $\pm$ 17,52	152,36 $\pm$ 13,61	148,82 $\pm$ 13,35	5,127	<b>0,012</b>	K>PY
<b>Glukagon – 8</b> (ng/L)	159,73 $\pm$ 12,61	160,73 $\pm$ 10,34	164,82 $\pm$ 14,86	0,493	0,615	-
<b>FABP4 – 0</b> (ng/ml)	4,53 $\pm$ 0,41	4,28 $\pm$ 0,59	4,63 $\pm$ 0,85	0,850	0,438	-
<b>FABP4 – 8</b> (ng/ml)	5,08 $\pm$ 0,61	5,27 $\pm$ 0,5	5,44 $\pm$ 0,41	1,349	0,275	-
<b>Glikoz – 0</b> (m/dl)	103,2 $\pm$ 6	108,82 $\pm$ 13,49	105,55 $\pm$ 14	0,594	0,559	-
<b>Glikoz – 8</b> (m/dl)	100,18 $\pm$ 6,65	96,82 $\pm$ 6,01	92,27 $\pm$ 5,83	4,547	<b>0,019</b>	K>PY
<b>Ağırlık – 0</b> (g)	313,73 $\pm$ 18,77	321 $\pm$ 10,29	312,91 $\pm$ 13,14	1,038	0,367	-
<b>Ağırlık – 8</b> (g)	372,64 $\pm$ 24,6	378 $\pm$ 19,8	362,09 $\pm$ 15,5	1,747	0,192	-

$\mu$ M:mikromolar, ng:nanogram, ml:mililitre, mIU:miliinternationunit, L:litre, mg:miligram, dl:desilitre g:gram  
PD: Propiyonat Düşük Doz  
PY: Propiyonat Yüksek Doz  
Gruplar arasında ölçüm değerleri bakımından karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA kullanılmıştır.

Tablo 4.4'te sunulan analizler aşağıdaki gibidir:

Propiyonik asit parametresinin 0. gün ölçümlerinde Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). Bu farklılık

PD grubu ölçümlerinin Kontrol ve PY grubu ölçümlerinden düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Propiyonik asit parametresinin 8. hafta ölçümlerinde Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p=0,235$ ).

İnsülin parametresinin hem 0. gün ölçümlerinde hem de 8. hafta ölçümlerinde Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (0. Gün  $p=0,692$ ; 8. Hafta  $p=0,150$ ).

Glukagon parametresinin 0. gün ölçümlerinde Kontrol ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,012$ ). Bu farklılık Kontrol grubu ölçümlerinin PY grubu ölçümlerinden yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. PD grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

Glukagon parametresinin 8. hafta ölçümlerinde Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p=0,615$ ).

FABP4 parametresinin hem 0. gün ölçümlerinde hem de 8. hafta ölçümlerinde Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (0. Gün  $p=0,438$ ; 8. Hafta  $p=0,275$ ).

Glikoz parametresinin 0. gün ölçümlerinde Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p=0,559$ ).

Glikoz parametresinin 8. hafta ölçümlerinde Kontrol ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,019$ ). Bu farklılık Kontrol grubu ölçümlerinin PY grubu ölçümlerinden yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. PD grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

Ağırlık parametresinin hem 0. gün ölçümlerinde hem de 8. hafta ölçümlerinde Kontrol, PD ve PY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (0. Gün  $p=0,367$ ; 8. Hafta  $p=0,192$ ).

## 5. TARTIŞMA

İnsanlığın en önemli meselelerinden bir tanesi hayatının devamlılığını sağlayacak gıdaya ulaşmaktır. Eski çağlardan beri insanlar elde ettikleri besinleri, deneyimlerine dayanarak koruyacak önlemler almıştır. Zamanla gıdaların muhafazası için daha fazla bilgiye sahip olunmuş ve belirli standartlar getirilerek bugünkü GKM teknolojilerine erişilmiştir (78). GKM'lerin sağlık etkileri sürekli araştırılmakta ve güncellenmektedir. Bilim dünyasındaki gelişmeler, her gün pek çok gıda ile beraber maruz kaldığımız kimyasalların insan sağlığına etkilerini ortaya koymaktadır.

Fırıncılık ürünleri dayanıklılığı zayıf olan gıdalardır. Gıda endüstrisinde unlu mamüllerde koruyucu olarak sodyum ve kalsiyum propiyonat, sorbik asit ve potasyum sorbat, sodyum benzoat, sodyum diasetat, metilparaben ve asetik asit kullanılır. Bu çalışmaya konu olan kalsiyum propiyonat (E283), fırıncılık ürünlerinde yaygın olarak kullanılan bir GKM'dir (79). Son yıllarda yapılan araştırmalar propiyonik asit ve tuzlarının (E280-283) olası risklerini ortaya koymuş ve konu giderek daha dikkat çekici olmaya başlamıştır (5,29,32-34). Bu çalışmada kalsiyum propiyonatin glisemik parametreler üzerine etkisini araştırarak, insülin direncine giden sürece bir etkisinin olup olmayacağını görmek amaçlanmıştır. Çalışma için kontrol grubunun yanında, biri işlenmiş gıdaları içeren bir diyetle maruz kalınan propiyonik asit miktarı 15 mg/kg/gün'e denk olan düşük doz grubu ve diğeri de sıçanlar için bir limit değeri olan 300 mg/kg/gün'e denk olan NOAEL dozu olmak üzere iki ayrı doz seçimi yaptık. Literatürde sekiz hafta gibi uzun bir zamanda sıçanlara uyguladığımız iki ayrı dozda kalsiyum propiyonatin oral uygulanmasının PA, insülin, glukagon, FABP4 ve glikoz düzeyleri ile ağırlık değişimine etkilerine dair bir çalışmaya rastlamadık. Bu güncel konuda araştırma yaparak literature katkı sağlamak istedik.

### 5.1. KAN PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada deney öncesi kanları alınan sıçanlara, 8 hafta süresince oral olarak gıda koruyucu kalsiyum propiyonat verildi ve deney sonunda tekrar kanları alındı. Kalsiyum propiyonat etkeninin bazı kan parametreleri üzerine etkisi ve gruplar arasında fark olup olmadığı araştırıldı.

Wolever, PA'nın sağlıklı insanlara rektal infüzyon solüsyonuyla uygulamasının serum PA'yı artırdığını bulmuştur (80). Tirosh ve ark. insanlarda öğüne eklenmiş 1 g

kalsiyum propiyonatın oral yolla alınımının akut etkisini incelemiş ve postprandiyal plazma propiyonatında önemli düzeyde artış gözlemlemiştir (5).

Tirosh ve ark.'nın çalışmasında propiyonat verilmesiyle kanda akut PA artışı gözlemlendiği gibi bizim çalışmamızda da uzun dönemde benzer bir etki gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre dışarıdan kalsiyum propiyonat uygulaması dolaşımdaki PA üzerine gruplar arasında anlamlı bir farka sebep olmuştur ( $p=0,024$ ). En yüksek değişim, düşük dozda kalsiyum propiyonat alan grupta (PD) kan düzeyinde artış şeklinde olmuştur. Ancak bu değişim Tablo 4.2 ve Tablo 4.4'te de görüldüğü gibi PD grubundaki sıçanların 0. gün propiyonik asit değerlerinin diğer grupların ortalamalarından belirgin düzeyde düşük olmasından kaynaklanıyor olabilir. PA'nın endojen üretimi ve bu üretimin beslenme, bağırsak mikrobiotası gibi koşullara bağlı değişkenliği de düşünüldüğünde elde edilen bulgular tartışmalıdır (26,30).

#### **5.1.1. Glikoz Düzenlenmesi Üzerine Etkilerin Değerlendirmesi: İnsülin, Glukagon, FABP4 ve Glikoz**

Propiyonik asit ile 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar PA'nın kan şekeri ve insülini azaltıcı etkisi olduğu yönündedir. Liljeberg ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda laktik asit veya sodyum propiyonat içeren ekmeğin tokluk kan şekerini ve insülin yanıtını önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir (81,82). Ayrıca Darwiche ve ark. sodyum propiyonat içeren arpa ekmeğinin gastrik boşalma hızını yavaşlattığını, buna bağlı olarak glisemik yanıtın azaldığını ve düşük insülinemik tepkiler oluştuğunu göstermiştir (83).

Geçmiş yıllarda genel kanı, PA'nın insülini azalttığı yönünde iken Darzi ve ark. oral PA uygulamasından sonra ilk kez insanlarda postprandiyal insülineminin artabileceğini tespit etmişlerdir. PA'nın glukoneojenik aktivitesine dayanarak dolaşımdaki glikozun artmasına bağlı insülinde bir artış olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Önceki çalışmalarda bu etkiye bağlı olarak insülin düzeylerinin neden etkilenmediğini ise o çalışmalarda kullanılan ekmeğin nahoş tadından ve buna bağlı gastrik boşalma hızının daha yavaş olmasından ileri gelebileceği şeklinde yorumlamışlardır (9).

2019 yılına gelindiğinde Tirosh ve ark. farelere intraperitoneal enjeksiyonla eşit molarlarda PA ve piruvat uygulayarak kan glikozunu artırma yeteneklerini karşılaştırmışlardır. PA'nın piruvata göre kan glikozunu daha çok artırdığını ve plazma

insülin düzeylerinde de uyumlu bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Uygulanan PA miktarı arttıkça glisemik cevapta da artış gözlenmiştir. Aynı zamanda oral yoldan PA uygulandığında da intraperitoneal PA uygulamasına benzer etkiler gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada farelere PA'nın oral yoldan verilmesi ile rektal tatbikatı arasında bir karşılaştırma yapılmış ve oral uygulamanın daha belirgin sistemik etkileri olabileceğini düşünmüşlerdir. Yine aynı araştırmanın bir parçası olarak Tirosh ve ark. bir başka çalışma modeli ile, işlenmiş gıdaların tüketildiği bir diyetle günlük olarak maruz kalınan PA'nın kronik maruziyetinin etkilerini araştırmıştır. C57BL6 farelerinin içme suyuna 15 mg/kg oranında katılan sodyum propiyonatın kronik etkisine baktıkları çalışmada hiperinsülinemi, hiperglukagonemi ve kan glikozunda artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca hepatik glikojenolizde de artış rapor edilmiştir. Tirosh ve ark. PA'nın insanlar üzerindeki etkisine de bakmışlar ve 14 sağlıklı katılımcı ile randomize, plasebo kontrollü, çift kör, çapraz çalışma modeli ile kalsiyum propiyonat maruziyetinin akut etkilerini araştırmışlardır. 8 saat aç bırakılan katılımcıların, 1 g kalsiyum propiyonat içeren bir öğün ve plasebo öğün tüketiminden sonra yarım saat ara ile 4 saat boyunca kan örnekleri toplanmıştır. PA içeren öğünün tüketiminin ardından plaseboya kıyasla plazma norepinefrin, glukagon ve FABP4'te artış gösterilmiştir. Öğün sonrası insülin duyarlılığında önemli bir düşüş gözlenmiştir (5).

Bu konuda karşılaştığımız en güncel çalışma, Adler ve ark.'nın 2021 yılında kalsiyum propiyonatın insanlarda glikoz metabolizması üzerine akut etkisi olup olmayacağını inceledikleri çalışmadır. 28 sağlıklı insanla yapılan randomize, plasebo kontrollü, çapraz çalışmada gönüllüler, 7 gün PA içermeyen bir diyetin ardından randomizasyon ve çaprazlama sağlanarak düşük doz kalsiyum propiyonat tüketmişlerdir. Kalsiyum propiyonat tüketimi plaseboya göre insülin karşıtı düzenleyici yanıtın aktive olması ve buna bağlı glukagon, norepinefrin ve epinefrinde artışla sonuçlanmıştır. Ayrıca aynı çalışma ile PA'nın, hipoglisemi koşullarında endojen glikoz üretimini de artırdığını gözlemlemişlerdir (34).

Görüldüğü gibi literatürde propiyonik asit ve tuzlarının insülin ve kan şekeri üzerindeki etkilerine dair çelişkili sonuçlar ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada ise literatürde bulunan insülini düşürücü ya da artırıcı etkilerin ikisini de gözlemlemedik. Elde edilen sonuçlarda insülin değerlerinde 0. gün ve 8. hafta ölçümleri arasındaki fark üç grupta da anlamlıydı ancak üç grubun kendi arasında anlamlı bir değişimi olduğunu

gözlemlemedik. Dolayısı ile insülin hormonu değişiminin kalsiyum propiyonat maruziyetinden etkilenmediğini söyleyebiliriz.

Kolonda üretilen PA'nın, glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) gibi bağırsak hormonlarını uyarma yeteneği bulunmaktadır ve iştahın baskılanması, düzenlenmesi, vücut ağırlığı yönetimi ve glisemik kontrol ile bağlantısı olabilir (84).

1991 yılında Wolever, 6 sağlıklı insan üzerinde yaptığı çalışmada, PA'nın rektal uygulamasının serum glikoz ve glukagonunu artırdığını bulmuştur (80).

Dolaşıma giren endojen veya eksojen PA'nın glukagonu artırabileceği yönündeki literatür bilgisinden yola çıkarak gıda katkı maddesi olan kalsiyum propiyonatın glukagon değerleri üzerine etkisinin olup olmadığını araştırdık. Ölçümlerle elde edilen sonuçlara göre yalnızca PY grubunda bir artış olduğunu ancak bu artışın kalsiyum propiyonat etkeninden kaynaklanmadığı kanaatine vardık.

FABP4 hormonu lipid metabolizması ile ilişkili bir hormon olmasına rağmen pankreas  $\beta$ -hücreleri, hepatositler gibi periferik hücreleri de etkileyerek karbonhidrat metabolizmasını da etkiler (39). İnsülin direnci, obezite, tip2 diyabet ve metabolik sendrom ile serum FABP4 seviyelerinin yükselmesi arasında ilişki gösterilen çalışmalar bulunmaktadır (36,40–42).

Yu ve ark. propiyonat ve diğer KZYA maruziyetinin, adipoz farklılaşması sırasında FABP4 ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını tespit etmiştir (85).

2021 yılında Prentice ve ark. FABP4'ün yalnız başına değil ADK ve NDPK ile kompleks oluşturarak metabolik etkiler gösterdiklerini gözlemlemişler ve bu hormon kompleksini "Fabkin" olarak adlandırmışlardır. Yeni tanımlanan Fabkin hormon kompleksi (FABP4–ADK–NDPK), enerji akışının metabolik organların işleyişi ile ilişkisine dair yeni bir fikir vermiştir. Ayrıca Fabkin'in insülin direnci, diyabet gibi patolojik durumlara etkisinin olabileceğini göstermişlerdir (42). Fabkin'in glikoz homeostazındaki etki mekanizmalarına bakıldığında, glikozla uyarılan insülin sinyalinin bozulması, hücre içi kalsiyum akışında ve beta hücre disfonksiyonunda değişimler ve endoplazmik retikulum stresiyle bağlantısı olduğu görülmüştür (86). PA'nın da dolaşımdaki FABP4'ü artırabileceği yönündeki literatür bilgisi, kalsiyum propiyonat maruziyetinin insülin direnci ile olan bağlantısının FABP4 ve Fabkin üzerinden gerçekleşme ihtimalini akla getirmektedir.

Bir başka çalışmada Tirosh ve ark. propiyonatin farelerde glukagon ve FABP4'ün plazma konsantrasyonunu artırdığını ve buna bağlı olarak da glikojenolizi ve hiperglisemiye uyardığını rapor etmişlerdir. Tirosh ve ark. yaptığı çalışmaya göre propiyonat ex vivo modelde kemirgen pankreas adacıkları ve adipoz dokuda doğrudan glukagon veya FABP4 salgılanmasına sebep olmazken in vivo modelde salgılanmasına yol açmıştır. Bu sonuçları, PA'nın glukagon ve FABP4 hormonlarının salgılanmasının artmasını sempatik sinir sistemini harekete geçirerek insülin karşıtı çalışan hormonlardan norepinefrinin devreye girmesiyle sağladığı şeklinde yorumlamışlardır (5).

Güncelliğini koruyan ve yeni gelişmelerle hakkında daha çok bilgi sahibi olunmaya başlanan FABP4 hormonunun Tirosh ve ark.'nın yaptığı çalışmayla PA ile ilişkisi olabileceği görülmüştür. Bu etkiyi biz de değerlendirmek istedik. Kalsiyum propiyonatin sekiz hafta boyunca uygulandığı çalışmamızda serumdaki FABP4 düzeylerinde, PD ve PY grubunda anlamlı artış olsa da, bu artış kalsiyum propiyonattan etkilenmemiştir. PD ve PY gruplarındaki FABP4 artışının sebebi belirsizdir.

Daha önce de bahsettiğimiz gibi bazı çalışmalarda PA uygulaması ile glikozun azaldığı yönünde etki gözlenmiş olsa da farklı çalışmalarda glikoz artışı yönünde bulgular ortaya koyulmuştur. PA'nın hem glukoneojenik bir öncül olması hem de glukagon, norepinefrin ve FABP4 hormonlarının artışı hepatik glikoz üretimini destekler ve PA'nın hiperglisemik etkilerine aracılık eder (5,34). Ancak bu çalışmada glikoz düzeylerinde kalsiyum propiyonata bağlı bir değişim gözlemedik. Kalsiyum propiyonat etkeninden bağımsız olarak PD ve PY gruplarının glikoz düzeylerinde anlamlı bir düşüş vardı. Kan glikoz düzeylerindeki düşmenin sebebi, 0. günle 8. hafta arasında insülin hormonunda anlamlı ölçüde artış olmasına bağlı olabilir. 0. gün ölçümlerinde kontrol grubunun glikoz düzeyi ortalaması PY grubundan anlamlı ölçüde yüksekti. Bu yüzden kontrol grubunun 8. hafta glikoz ortalaması insülin artışından diğer gruplar kadar etkilenmemiş olabilir.

## **5.2. AĞIRLIK DEĞİŞİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Propiyonik asit üzerine yapılan çalışmalarda dikkati çeken bir diğer husus da PA'nın iştah ve gıda alımı üzerine etkisidir. Liljeberg ve ark. sağlıklı insanlarla yaptığı çalışmada, sodyum propiyonat eklenmiş arpa ekmeği ile kontrol ekmeklerinin iştah, tokluk ve gıda alımlarını incelemiştir. Sonuçlara göre sodyum propiyonat içeren ekmek diğer ekmeklere kıyasla tokluk süresini anlamlı ölçüde artırmıştır (82).

Darzi ve ark. diğer çalışmaların aksi bir sonuç elde etmiştir. Çalışmalarında propiyonattan zengin ekşi maya ekmeğinin, kontrol ekmeğine göre iştahı ve gıda alımını etkilemediği görülmüştür. Bu durumun sebebi olarak, daha önceki çalışmalarda sodyum propiyonat eklenmiş ekmeklerin nahoş bir tada sahip olmasından kaynaklanabileceğini ve dolayısı ile duyuşal özelliklerin iştahı etkileyebileceğini öne sürmüşlerdir. Tüketilen besinlerin duyuşal özellikleri ile bağlantılı olarak gastrik boşalma hızının değişebileceğini varsaymışlardır (9).

Her ne kadar PA'nın iştah ve gıda alımını azalttığı yönünde literatür bilgisi bulunsa da dolaşımdaki PA ile obezite arasında da ilişki kurulmaktadır. Endojen propiyonat, karaciğerde glukoneogenez, liponeogenez ve protein sentezinde bir öncüdür. Zayıf, fazla kilolu ve obez gönüllüler arasında dışkıdaki KZYA miktarlarının kıyaslandığı bir çalışmada fazla kilolu ve obezlerde propiyonik asit miktarı daha yüksek bulunmuştur (87). Tirosh ve ark. obezite ve insülin direnci bulunan insanlarda kilo kaybına yönelik çeşitli diyetler uygulamış ve kilo vermeye bağılı olarak plazma PA düzeylerinin, 6.ve 24. aylarda başlangıçtaki plazma PA'ya göre azaldığını göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak obezite ve insülin direnci ile plazma PA düzeyleri arasında ilişki olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ek olarak, Tirosh ve ark. bir başka çalışmasında sodyum propiyonata düşük dozda (%0,15-0,3 mg/kg) kronik olarak maruz kalan farelerde hormonal değişimin yanı sıra kademeli ağırlık artışı da gözlemlemişlerdir (5).

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara göre her bir grupta anlamlı ölçüde ağırlık artışı olmuştur. Ancak bu artış, sıçanların hala gelişme döneminde olmasından ileri gelen doğal bir sonuç gibi görünmektedir. Aynı zamanda ağırlık artışı bakımından gruplar arasında fark bulunmamıştır. Bu sebeple çalışma tekrar edilecek olursa, ağırlık değişiminin daha iyi değerlendirilmesi, diğer hormonların düzeyleri ve ağırlık değişimi arasındaki ilişkilerin incelenebilmesi gibi ekstra durumlar için sıçanların büyüme ve gelişmesinin durması beklenebilir.

Sonuçların tümü değerlendirildiğinde, kalsiyum propiyonatin sadece PA düzeyinde bir farklılığa sebep olduğu ancak insülin, glukagon, FABP4 ve glikoz düzeyleri ile ağırlık üzerine etki etmediği söylenebilir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre düşük ve yüksek dozda kalsiyum propiyonata maruziyet sonucu insülin direnci gelişimine dair bir bulgu tespit etmedik. Bu yüzden PA haricindeki parametrelerde grupların kendi içinde ilk ve son ölçümlerinin arasında fark bulunmasının altında yatan bilmediğimiz başka bir

sebepe bulunduğu çıkarımı yapılabilir. Sıçanların gelişme döneminde olması, ağırlık kazanımının devam etmesi gibi stabil olmayan koşullar ile bu parametrelerdeki değişim arasında ilişki bulunuyor olabilir.

Propiyonik asit maruziyetiyle ilgili yapılan çalışmaların bir kısmı akut etkiyi ölçmüştür. PA'nın uzun dönem etkisine dair çalışma daha az sayıdadır. Bu sebeple kronik etkinin gözlemlenmesi için ne kadar süreye ihtiyaç olacağı konusu belirsizdir. Bu çalışmada sekiz hafta uygulama yapıldı. Ancak bu sekiz haftalık süre kalsiyum propiyonatın kronik etkisini gözlemlemek için yeterli bir süre olmayabilir. Yine bir varsayım ile, PA'nın belirgin etkisinin belki de akut olarak kendini gösterdiğini ve kronik maruziyette metabolizmanın bunu tolere edebileceği düşünülebilir.

### **5.3. UNLU MAMULLERDE KALSİYUM PROPİYONAT KULLANIMINA YÖNELİK SON SÖZLER VE ÇIKARIM**

Kalsiyum propiyonat ekmek ve türevlerinin yapımında en yaygın kullanılan koruyucudur. Her ne kadar bu çalışmada kalsiyum propiyonat etkenine bağlı kan bulgularında PA düzeyindeki değişim haricinde başka bir değişime rastlanmamış olsa da literatürde zararlarına ve risklerine yönelik çalışmalar görölmektedir. Bu yüzden sağlık açısından daha risksiz alternatif yöntemler geliştirilebilir. Örneğin; ekşi maya eklenmiş ekmekle kalsiyum propiyonat eklenmiş ekmeğin raf ömrünün kıyaslandığı bir çalışmada, % 0,3 oranında kalsiyum propiyonat eklenmesi ekmeğe 10-12 gün raf ömrü sağlarken ekşi maya 12-14 güne kadar uzatmıştır. Ayrıca ekşi mayalı ekmekle kalsiyum propiyonat içeren ekmeklerde benzer antifungal aktivite gözlemlenmiştir (88).

Ekmek ve türevlerini korunmasının sağlanması için kullanılan yeni yöntemlerden biri de *Lactobacillus amylovorus DSM 19280* gibi antifungal bileşikler üreten biyolojik ajanlardır. Ekmeğe eklenen kalsiyum propiyonat ile *Lactobacillus amylovorus DSM 19280* ile fermente edilmiş ekşi maya etkinliğinin kıyaslandığı bir çalışmada, kalsiyum propiyonatın daha az antifungal etki gösterdiğini saptanmıştır (89).

Yaygın olmamakla birlikte fırıncılık ürünlerinde doğal koruyucular, uçucu yağlar da kullanılabilir. Zerdeçal, portakal, limon out, kekik gibi uçucu yağların, içeriğindeki antimikrobiyal bileşenler sayesinde koruyucu etki gösterdiğini düşünölmektedir (90). Kapsüllenmiş kekik esansiyel yağının, sentetik koruyucular kullanmadan, keklerin raf ömrünü en az 30 gün koruduğu görölmüştür (91).

Sentetik ya da zararlı olabilecek gıda koruyucu kimyasalların yerine doğal alternatiflerinin kullanılması üzerine araştırmaların olması sevindiricidir.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre kalsiyum propiyonatın düşük dozda ya da yüksek dozda alınması, serum PA değeri üzerinde bir değişikliğe sebep olmuş ancak glisemik yanıtta etki etmemiştir. Grupların kendi içinde değişim farkları anlamlı olsa da insülin, glukagon, glikoz, FABP4 ve ağırlık parametrelerindeki 0. gün ve 8. hafta arasındaki değişim kalsiyum propiyonat etkeninden bağımsız çıkmıştır. Sıçanlarda insülin direnci gelişebileceğine dair bir bulguya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada her ne kadar propiyonik asitin insülin direncine ya da glisemik yanıtta değişime neden olmadığını rapor etsek de literatürde aksini belirten çalışmalar bulunmaktadır. Ve bu durum, propiyonik asit içeren besinlerin tüketilmesinin halk sağlığı açısından hala riskli olabileceğini düşündürür. PA ve tuzlarına en sık maruz kaldığımız ekmek gibi temel bir gıdada, daha güvenli ve doğal gıda koruyucuların kullanılması için araştırmalar yapılmalıdır.

Bir gıda koruyucu olarak PA ve tuzlarının kullanımı GRAS (Genel Olarak Güvenli) kabul edilse de kronik maruziyetin insan sağlığına etkilerinin değerlendirilmesi için daha detaylı ve uzun süren insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Çalışma için seçtiğimiz 8 haftalık süre propiyonik asitin uzun dönem etkilerini gözlemlemek için yeterli gelmemiş olabilir. Yine bu konuda yapılan çalışmaların genel olarak akut etki açısından incelendiği düşünülürse, aynı anda hem akut etki hem de kronik etki gözlenmesine olanak tanıyacak uzun süreli bir çalışma modeli geliştirilebilir. Böylece akut etki ve kronik etki arasında bir fark olur olmadığı anlaşılabilir.

Çalışmanın tekrar edilebilirliği açısından modelleme önerimiz sıçan ağırlığının stabil olduğu erişkinlik döneminde yapılmasıdır. Bu çalışmanın sıçanların erişkinlik çağına ulaşmadan yapılmış olması, propiyonik asitin ağırlık artışı ile de ilişkilendirilememesine sebep olmuştur. Özellikle propiyonik asit tüketiminin etki ettiği FABP4 hormonunun adipoz dokudan salgılanıyor olması sebebiyle büyüme durduktan sonra oluşabilecek ağırlık artışı ile de bağlantılı olabileceğine dair bir kıyaslama yapılamamıştır. Bu çalışmada FABP4 artışı ağırlık artışından bağımsız olarak ele alınmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Maslow, A. H. (1958). A Dynamic Theory of Human Motivation. In C. L. Stacey & M. DeMartino (Eds.), *Understanding human motivation* (pp. 26–47). Howard Allen Publishers <https://doi.org/10.1037/11305-004>
2. Prentice, KJ., Saksi, J., Hotamisligil, GS. (2019). Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *Journal of Lipid Research. American Society for Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 60, p. 734–40.
3. Saltmarsh, M. (2020). Chapter 1. Food Additives and Why They Are Used. In: Saltmarsh's Essential Guide to Food Additives. Royal Society of Chemistry; p. 1–9.
4. Gültekin, F. Fark Etmeden Yediklerimiz: A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri. İstanbul; 2021. 322–324 p.
5. Tirosh, A., Calay, ES., Tuncman, G., Claiborn, KC., Inouye, KE., Eguchi, K., et al. (2019). The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Sci Transl Med.* 11(489):1–14.
6. EFSA. *Scientific Opinion on the re-evaluation of propionic acid (E 280), sodium propionate (E 281), calcium propionate (E 282) and potassium propionate (E 283) as food additives.* Jul 2014. EFSA Journal. 1;12(7).
7. Gaynor PM. *GRAS Notice (GRN) No. 786* <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory> OFFICE OF re: GRAS Notification for the Use of Calcium Propionate on Processed (Sliced/Cut) Fruits and Vegetables. 2018. Washington D.C. <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>
8. Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü. *Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik 2017.* Resmi Gazete, 30188. 2017, Eylül. Erişim: 2.12.2022, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/09/20170922-4.htm>
9. Darzi, J., Frost, GS., Robertson, MD. (2012). Effects of a novel propionate-rich sourdough bread on appetite and food intake. *Eur J Clin Nutr.* 66(7):789–94.
10. Türk Gıda Kodeksi. (TGK). Resmi Gazete, 28693. 2013, Haziran. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm>
11. FDA. *Overview of Food Ingredients, Additives & Colors International Food Information Council (IFIC) and U.S. Food and Drug Administration (FDA)* [Internet]. 2004. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors#foodadd>
12. Carocho, M., Barreiro, MF., Morales, P., Ferreira, ICFR. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Vol. 13, p. 377–99.
13. REGULATION (EC) No 1333/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on food additives (Text with EEA relevance). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32008R1333>
14. Magnuson, B., Munro, I., Abbot, P., Baldwin, N., Lopez-Garcia, R., Ly, K., et al. (2013). Review of the regulation and safety assessment of food substances in various countries and jurisdictions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 30(7):1147-220. doi: 10.1080/19440049.2013.795293.
15. Walker, R. Toxicity testing and derivation of the ADI. *Food Addit Contam.* (1998) 15:11–6. Erişim: 03.12.2022, <https://doi.org/10.1080/02652039809374611>
16. General Standard For Food Additives. (1995) Erişim: 3.12.2022, <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>.
17. E number | EFSA [Internet]. Erişim : 3.12.2022, <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/e-number>
18. Türk Gıda Kodeksi Gıda Etiketleme Ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği. 29960. 2017, Ocak. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/01/20170126M1-6.htm>
19. Dufossé, L., Grieco, F., di Scienze, I., Alimentari, P., Tang, Y., Kallscheuer, N. (2018) Engineered Microorganisms for the Production of Food Additives Approved by the European Union-A Systematic Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9:1746. doi: 10.3389/fmicb.2018.01746.
20. Hasegawa, MM., Nishi, Y., Ohkawa, Y., Inui, N. (1984). Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured chinese hamster cells. *Food and Chemical Toxicology.* Jul 1;22(7):501–7.
21. Abo-EL-Sooud, K., Hashem, MM., Badr, YA., Eleiwa, MME., Gab-Allaha, AQ., Abd-Elhakim, YM. (2018). Assessment of hepato-renal damage and genotoxicity induced by long-term exposure to five

- permitted food additives in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(26):26341–50. Erişim 03.12.2022, <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-2665-z>
22. Rencüzoğullari, E., Azirak, S., Canimoglu, S., Parlak, S., Buyukleyla, M. (2009). Effects of natamycin on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronucleus in human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*. 32(1):47-52. doi: 10.1080/01480540802431371. PMID: 19514938.
23. Türkoğlu, Ş. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food and Chemical Toxicology*, 1,46(6):2035–41.
24. Ammar, EM., Philippidis, GP. (2021). Fermentative production of propionic acid: prospects and limitations of microorganisms and substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 105, p. 6199–213.
25. Dahl, WJ., Agro, NC., Eliasson, ÅM., Mialki, KL., Olivera, JD., Rusch, CT., et al. (2017). Health Benefits of Fiber Fermentation. *Journal of the American Collage of Nutrition*. 17;36(2):127–36.
26. Al-Lahham, SH., Peppelenbosch, MP., Roelofsen, H., Vonk, RJ., Venema, K. (2010). Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Vol. 1801, p. 1175–83.
27. EFSA. *Safety of the extension of use of sodium propionate (E 281) as a food additive*. EFSA Journal. 2016;14(8).
28. Harrison, PTC. (1992). Propionic acid and the phenomenon of rodent forestomach tumorigenesis: a review. *Food and Chemical Toxicology*. Apr;30(4):333-40. doi: 10.1016/0278-6915(92)90012-a.
29. Yilmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M. (2014). DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 30(10):926–37. Erişim: 05.12.2022, [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233712466132?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233712466132?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed)
30. Abdelli, LS., Samsam, A., Naser, SA. (2019). Propionic Acid Induces Gliosis and Neuro-inflammation through Modulation of PTEN/AKT Pathway in Autism Spectrum Disorder. *Sci Rep*. 1;9(1).
31. Witters, P., Debbold, E., Crivelly, K., vande Kerckhove, K., Corthouts, K., Debbold, B., et al. (2016). Autism in patients with propionic acidemia. *Mol Genet Metab*. 1;119(4):317–21.
32. Dengate, S., Ruben, A. (2002). Controlled trial of cumulative behavioural effects of a common bread preservative. *J Paediatr Child Health*. 38(4):373–6.
33. Pettenuzzo, LF., Schuck, PF., Fontella, F., Wannmacher, CMD., Ngela, A., Wyse, T., et al. (2002). Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 73(3):623-9. [www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh](http://www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh)
34. Adler, GK., Hornik, ES., Murray, G., Bhandari, S., Yadav, Y., Heydarpour, M., et al. (2021). Acute effects of the food preservative propionic acid on glucose metabolism in humans. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 26;9(1).
35. Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., Miura, T. (2014). Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): Pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*. p. 23–33.
36. Furuhashi, M., Fucho, R., Görgün, CZ., Tuncman, G., Cao, H., Hotamisligil, GS. (2008). Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 118(7):2640-50.
37. Schlottmann, I., Ehrhart-Bornstein, M., Wabitsch, M., Bornstein, SR., Lamounier-Zepter, V. (2014). Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes. *Int J Obes*. 11;38(9):1221–7.
38. Elmasri, H., Karaaslan, C., Teper, Y., Ghelfi, E., Weng, MQ., Ince, TA., et al. (2009). Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB Journal*. 1;23(11):3865–73.
39. Dou, HX., Wang, T., Su, HX., Gao, DD., Xu, YC., Li, YX., et al. (2020). Exogenous FABP4 interferes with differentiation, promotes lipolysis and inflammation in adipocytes. *Endocrine*. 1;67(3):587–96.
40. Teoman Uysal, K., Scheja, L., Wiesbrock, SM., Bonner-Weir, S., Go, G., Hotamisligil, GS., et al. (2000). Improved Glucose and Lipid Metabolism in Genetically Obese Mice Lacking aP2. *Endocrinology*. 141(9):3388-96.
41. Lamounier-Zepter, V., Look, C., Alvarez, J., Christ, T., Ravens, U., Schunck, WH., et al. (2009). Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: A new link between obesity and heart disease. *Circ Res*. 14;105(4):326–34.
42. Prentice, KJ., Saksi, J., Robertson, LT., Lee, GY., Inouye, KE., Eguchi, K., et al. (2021). A hormone complex of FABP4 and nucleoside kinases regulates islet function. *Nature*. 23;600(7890):720–6.
43. Balci, T., Kocabas, R., Cuce, G., Akoz, M. (2021). Inhibition of Fatty acid binding protein 4 in obese male mice adversely affects reproductive parameters. *J Reprod Infertil*. 1;22(1):16–22.

44. Cao, H., Sekiya, M., Ertunc, ME., Burak, MF., Mayers, JR., White, A., et al. (2013). Adipocyte lipid chaperone aP2 Is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab.* 7;17(5):768–78.
45. Cao, H., Gerhold, K., Mayers, JR., Wiest, MM., Watkins, SM., Hotamisligil, GS. (2008). Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell.* 19;134(6):933–44.
46. Hotamisligil, GS., Johnson, RS., Distel, RJ., Ellis, R., Papaioannou, VE., Spiegelman, BM. (1996). Uncoupling of Obesity from Insulin Resistance Through a Targeted Mutation in aP2, the Adipocyte Fatty Acid Binding Protein. *Science.* 22;274(5291):1377-9. doi: 10.1126/science.274.5291.1377.
47. Na Ge, X., Bastan, I., Dileepan, M., Greenberg, Y., Gil Ha, S., Steen, KA., et al. (2018). FABP4 regulates eosinophil recruitment and activation in allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 315:227–40.
48. Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, MF., Garvey, WT., Johnson, RH. (2002). The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1. *Atherosclerosis.* 165(2):259-69.
49. Kleinert, M., Sachs, S., Habegger, KM., Hofmann, SM., Müller, TD. (2019). Glucagon regulation of energy expenditure. *International Journal of Molecular Sciences.* 30;20(21):5407.
50. Kedia, N. (2011). Treatment of severe diabetic hypoglycemia with glucagon: an underutilized therapeutic approach. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 4:337-46.
51. Jiang, G., Zhang, BB. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(4):E671-8.
52. Heppner, KM., Habegger, KM., Day, J., Pfluger, PT., Perez-Tilve, D., Ward, B., et al. (2010). Glucagon regulation of energy metabolism. *Physiol Behav.* 100(5):545–8.
53. Galsgaard, KD., Pedersen, J., Knop, FK., Holst, JJ., Albrechtsen, NJW. (2019). Glucagon receptor signaling and lipid metabolism. *Frontiers in Physiology.* 24;10:413.
54. Davies, MJ., Aroda, VR., Collins, BS., Gabbay, RA., Green, J., Maruthur, NM., et al. (2022). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia.* 1;65(12):1925–66.
55. Türkiye Diyabet Vakfı. (2021). Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi [https://www.turkdiab.org/admin/PICS/webfiles/Diyabet\\_Tani\\_ve\\_Tedavi\\_Rehberi\\_2021.pdf](https://www.turkdiab.org/admin/PICS/webfiles/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2021.pdf)
56. Briant, L., Salehi, A., Vergari, E., Zhang, Q., Rorsman, P. (2016). Glucagon secretion from pancreatic a-cells. *Ups J Med Sci.* 121(2):113-9.
57. Jones, BJ., Tan, T., Bloom, S. (2012). Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology.* p. 1049–54.
58. Woods, SC., Lutz, TA., Geary, N., Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* p. 1219–35.
59. Obici, S., Zhang, BB., Karkanias, G., Rossetti, L. (2002). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med.* 8(12):1376–82.
60. Gürdöl, F. *Tıbbi Biyokimya.* 2. Baskı. Gürdöl F, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2015.
61. Jones, AG., Hattersley, AT. (2013). The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetic Medicine.* p. 803–17.
62. Baumgard, LH., Hausman, GJ., Sanz Fernandez, MV. (2016). Insulin: Pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domestic Animal Endocrinology.* Vol:54 p. 76–84.
63. Kalwat, MA., Cobb, MH. (2017). Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the  $\beta$  cell. *Pharmacology and Therapeutics.* Vol:179 p. 17–30.
64. Campbell, JE., Newgard, CB. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Vol. 22, p. 142–58.
65. Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 4(1):177–97.
66. Scherer, T., Sakamoto, K., Buettner, C. (2021). Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nature Reviews Endocrinology.* Vol. 17, p. 468–83.
67. Huising, MO. (2020). Paracrine regulation of insulin secretion. *Diabetologia.* Vol. 63, p. 2057–63.
68. Tokarz, VL., MacDonald, PE., Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology.* Vol. 217, p. 2273–89.
69. Freeman, AM., Pennings, N. Insulin Resistance. 2022 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29939616.
70. Cao, W., Liu, HY., Hong, T., Liu, Z. (2010). Excess exposure to insulin may be the primary cause of insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.* 298(2):E372.
71. Petersen, MC., Shulman, GI. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 98:2133–223.

72. Saltiel, AR., Kahn, CR. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 13;414(6865):799-806. doi: 10.1038/414799a.
73. Yaribeygi, H., Farrokhi, FR., Butler, AE., Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 234, p. 8152–61.
74. Türkiye Diyabet Vakfı, İnsülin Direnci Çalıştayı Sonuç Raporu, (2017), 1. Baskı, İstanbul; ISBN: 978-975-98038-6-5.
75. Kaya, A. (2017). The Prevalence of Insulin Resistance In The Turkish Population Constructed with 3331 participants. *Eurasian J Med Oncol*. 2017;1. doi: 10.14744/ejmo.2017.02886
76. Tüfekçi Alphan, E. Hastalıklarda Beslenme Tedavisi. Ankara: Hatipoğlu Yayınları; 2014. 385–414 p.
77. Heim, KE., Morrell, JS., Ronan, AM., Tagliaferro, AR. (2002). Effects of ketamine-xylazine and isoflurane on insulin sensitivity in dehydroepiandrosterone sulfate-treated minipigs (*Sus scrofa domestica*). *Comp Med*. 52(3):233-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12102568/>
78. Joardder, MUH., Masud, MH. (2019). A Brief History of Food Preservation. In: Food Preservation in Developing Countries: Challenges and Solutions. *Springer International Publishing; 2019*. p. 57–66.
79. Smith, JP., Daifas, DP., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., El-Khoury, A. (2004). Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 44,p. 19–55.
80. Wolever, TM. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am J Clin Nutr*. 53:681–7.
81. Liljeberg, HG., Björck, IM. (1996). Delayed gastric emptying rate as a potential mechanism for lowered glycemia after eating sourdough bread: studies in humans and rats using test products with added organic acids or an organic salt. *Am J Clin Nutr*. 64(6):886-93. doi: 10.1093/ajcn/64.6.886.
82. Liljeberg, HGM., Lonner, CH., Bjorck, IME. (1995). Sourdough Fermentation or Addition of Organic Acids or Corresponding Salts to Bread Improves Nutritional Properties of Starch in Healthy Humans. *J Nutr*. 125(6):1503–11.
83. Darwiche, G., Östman, EM., Liljeberg, HGM., Kallinen, N., Björgell, O., Björck, IME., et al. (2001). Measurements of the gastric emptying rate by use of ultrasonography: studies in humans using bread with added sodium propionate. *Am J Clin Nutr*. 74(2):254–8.
84. Caengprasath, N., Gonzalez-Abuin, N., Shchepinova, M., Ma, Y., Inoue, A., Tate, EW. (2020). Internalization-Dependent Free Fatty Acid Receptor 2 Signaling Is Essential for Propionate-Induced Anorectic Gut Hormone Release. *iScience*, 25, 23(9).
85. Yu, H., Li, R., Huang, H., Yao, R., Shen, S. (2018). Short-Chain fatty acids enhance the lipid accumulation of 3T3-L1 cells by modulating the expression of enzymes of fatty acid metabolism. *Lipids*. 1,53(1):77–84.
86. Gargari, P., Mukhopadhyay, P., Saboo, B., Mishra, A., Ghosh, S. (2022). Fabkin and glucose homeostasis. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. 1,16(8).
87. Schwiertz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, NA., Donus, C. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), 190–5.
88. Belz, MCE., Mairinger, R., Zannini, E., Ryan, LAM., Cashman, KD., Arendt, EK. (2012). The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread. *Appl Microbiol Biotechnol*. 96(2):493-501
89. Ryan, LAM., Zannini, E., Dal Bello, F., Pawlowska, A., Koehler, P., Arendt, EK. (2011). *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *Indian Journal of Food Microbiology*, 29;146(3):276–83.
90. Gavahian, M., Chu, YH., Lorenzo, JM., Mousavi Khaneghah, A., Barba, FJ. (2018). Essential oils as natural preservatives for bakery products: Understanding the mechanisms of action, recent findings, and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 60(2):310–21.
91. Gonçalves, ND., Pena F de, L., Sartoratto, A., Derlamelina, C., Duarte, MCT., Antunes, AEC. (2017). Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Research International*, 1;96:154–60.

## EKLER

### EK-1.Etik Kurul Onayı



**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**  
**Çağış Yerleşkesi, (Bigadiç yolu üzeri 17. km) 10145, BALIKESİR-TÜRKİYE**  
**ARAŞTIRMA BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN ADI	"Oral Propiyonik Asit Tüketiminin Siçanlarda İnsülin Direncine Etkisi"		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye SBE Tıbbi Biyokimya AD.		
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Y. Lisans Öğrencisi Ayşe Şeyma ÇOBAN Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Öğr. Üyesi Saliha UYSAL Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Veteriner Hekim Mustafa Hilmi YARANOĞLU BAUNDEHAM		
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Yüksek Lisans		
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	15/02/2021 – 15/04/2022		
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	SIÇAN – 33 ADET		
<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi		
	HADYEK BAŞVURU FORMU	25/01/2022		
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Karar No : 2022/1-3		Tarih :24/02/2022	
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.			
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>				
<b>ÜYELER</b>				
<b>Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi</b>	<b>Uzmanlık Dalı</b>	<b>Kurumu</b>	<b>İlişki (*)</b>	<b>İmza</b>
Doç. Dr.Elif AKSÖZ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ali BAYRAKDAR Başkan Vekili	Veteriner Histoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ziya İLHAN Üye	Veteriner Mikrobiyoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Gülten ERKEN Üye	Tıbbi Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM Üye	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Muharrem EROL Üye	Veteriner Cerrahi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Dr. Öğr. Üyesi Fatih UGÜN Üye	Tıp - Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Dr. Öğr. Üyesi Özgür BULMUŞ Üye	Tıbbi Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Hacer ERDEN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Serap URAS Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Vet. Hek. Mustafa H. YARANOĞLU Üye	Veteriner Hekim	BAUNDEHAM	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

(\*) Başvurulan Projelerde Proje Sahibi veya Yardımcı Araştırmacılardan birinin Yerel Etik Kurul Üyesi veya 1. Derece Akrabası olması halinde ilgili üye proje kurul görüşmesine katılamaz.



