

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARE MİDE FUNDUSUNDA KARMEL BOYASININ
MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARI VE ZERDEÇAL
İLE OLAN ETKİLEŞMELERİ**

Ecz. Ece HALLAÇELİ

**TIBBİ FARMAKOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ**

ADANA-2019

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARE MİDE FUNDUSUNDA KARMEL BOYASININ
MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARI VE ZERDEÇAL
İLE OLAN ETKİLEŞMELERİ**

Ecz. Ece HALLAÇELİ

**TIBBİ FARMAKOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2017-
7443 Nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Tez No:.....
ADANA-2019**

KABUL ve ONAY

TIBB FARMAKOLOJİ Anabilim Dalı

TEZLİ Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

**“Fare Mide Fundusunda Karamel Boyasının Moleküler Etki Mekanizmaları ve Zerdeçal
ile olan Etkileşmeleri ”**

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 19/ 09 / 2019

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof Dr. Ergin Şingirik
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof Dr. Naciye Yaktubay Döndaş
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof Dr. Seyhan Şahan Fırat
Mersin Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 19 / 09 / 2019 tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 19/09/2019

Ece Hallaçeli

İMZA

Adı Soyadı

Kayıtlı olunan Program : TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS
Tezin Konusu : FARE MİDE FUNDUSUNDA KAMEL BOYASININ
MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARI VE ZERDEÇAL İLE OLAN ETKİLEŞMELERİ

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☒ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : PROF. DR. NACİYE YAKTUBAY DÖNDAŞ

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 05300138533

E-Posta : Yakdas25@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri : ECE HALLAÇELİ

Telefon : 05428262510

E-Posta : ecehallaceli@hotmail.com

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana değerli tecrübe ve fikirleri ile yol gösteren, engin bilgileriyle akademik olarak ilerlememe ışık tutan, her zaman şefkatini hissettiğim, beni yüreklendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Naciye Yaktubay Döndaş'a en derin şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarında yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ergin Şingirik'e, Sayın Prof. Dr. Cemil Göçmen'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçteki en büyük ve en kıymetli destekçilerim, üzerimdeki emekleri yadsınamaz olan, bana her zaman güç veren canım annem, babam ve kardeşime çok teşekkür ederim.

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2017-7443 Nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Mide Anatomisi ve İnnervasyonu	4
2.2. Gıda Katkı Maddeleri	5
2.2.1. Gıda Boyaları	5
2.2.2. Karamel Boyası	7
2.3. Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	8
2.3.1. Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) Kimyasal Bileşenleri	9
2.4. Ayurvedik Tıp	9
2.5. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Ajanlar ile İlgili Literatür Bilgisi	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	11
3.1. <i>İn vitro</i> Kalitatif Deneysel Çalışmalar	11
3.1.1. E150d Kontrol Deneyleri	11
3.1.2. Zerdeçal Kontrol Deneyleri	11
3.1.3. N ^w -nitro-L-arginin'in Uygulandığı Deneyler	12
3.1.4. Uvabain'in Uygulandığı Deneyler	12
3.1.5. Tetraetilamonyum'un Uygulandığı Deneyler	13
3.1.6. Verapamil'in Uygulandığı Deneyler	13
3.1.7. Rutenyum Kırmızısı'nın Uygulandığı Deneyler	14
3.2. <i>İn vitro</i> Kantitatif Deneysel Çalışmalar	14
3.3. Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Solüsyonlar	15

3.3.1. Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) Rizomu Ekstresi'nin Hazırlanması.....	16
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	16
4. BULGULAR.....	17
4.1. <i>İn vitro</i> Kalitatif Deney Bulguları	17
4.1.1. E150d Kontrol Deneylerinin Bulguları	17
4.1.2. Zerdeçal Kontrol Deneylerinin Bulguları	18
4.1.3. N ^w -nitro-L- Arginin Deneylerinin Bulguları.....	19
4.1.4. Uvabain Deneylerinin Bulguları	20
4.1.5. Tetraetilamonyum Deneylerinin Bulguları	21
4.1.6. Verapamil Deneylerinin Bulguları	22
4.1.7. Rutenyum Kırmızı Deneylerinin Bulguları.....	23
4.2. <i>İn vitro</i> Kantitatif Deney Bulguları	24
4.2.1. Superoksit Dismutaz (SOD) Deney Bulguları	24
4.2.2. Nitrit Seviyesi Deney Bulguları	25
4.2.3. Siklooksijenaz (COX) Deney Bulguları.....	26
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Karbakol (50 µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) ile oluşturulan gevşeme cevapları.	17
Şekil 2.	Karbakol (50µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde zerdeçal (10µl/ml)'in etkisi	18
Şekil 3.	Karbakol (50µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde L-NOARG (10 µM) ve L-NOARG (10µM)+Zerdeçal (10µl/ml)'in etkileri. *: Kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (P<0.05). +: L-NOARG gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (P<0.05).	19
Şekil 4.	Karbakol (50µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde uvabain (10 µM) ve uvabain(10µM)+zerdeçal (10 µl/ml)'in etkileri.....	20
Şekil 5.	Karbakol (50µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde TEA (50 µM) ve TEA (10µM)+Zerdeçal (10µl/ml)'in etkileri. **: Kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (P<0.01).	21
Şekil 6.	Karbakol (50µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde verapamil (10 µM) ve verapamil(10µM)+zerdeçal (10µl/ml)'in etkileri.....	22
Şekil 7.	Karbakol (50µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde rutenyum kırmızısı (10 µM) ve rutenyum kırmızısı(10µM)+zerdeçal (10 µl/ml)'in etkileri.....	23
Şekil 8.	İzole fare mide fundus dokularındaki SOD enzim aktivitesi üzerinde zerdeçal(10µl/ml, E150d (14mg/ml) ve zerdeçal(10µl/ml)+E150d(14mg/ml)'nin etkileri. ***: Kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (P<001). ++: E150d gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (P<0.01).	24
Şekil 9.	İzole fare mide fundus dokularındaki nitrit seviyesi üzerinde zerdeçal(10µl/ml), E150d (14mg/ml) ve zerdeçal(10µl/ml)+E150d(14mg/ml)'nin etkileri.....	25
Şekil 10.	İzole fare mide fundus dokularındaki COX enzim aktivitesi üzerinde zerdeçal(10µl/ml, E150d (14mg/ml) ve zerdeçal(10µl/ml)+E150d(14mg/ml)'nin etkileri.	26

ÖZET

Fare Mide Fundusunda Karamel Boyasının Moleküler Etki Mekanizmaları ve Zerdeçal ile Olan Etkileşmeleri

Bu çalışmada, amonyum sülfid karamel boyası (E150d)'nin izole fare mide fundusu üzerindeki etkileri araştırıldı. Buna ilave olarak, Ayurvedik drog olan zerdeçal (*Curcuma longa*)'ın E150d ile olan etkileşmeleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. Bütün deneylerde erkek fareler (*Swiss albino*) kullanıldı. Fareler servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra gastrik fundus izole edilerek içinde Tyrode solüsyonu bulunan, 37 °C'de muhafaza edilen ve %95 O₂+%5CO₂ ile havalandırılan ortamlarda muhafaza edildi.

Kalitatif deneysel çalışmalarda gastrik fundus şeritleri longitudinal olarak hazırlandı ve organ banyosuna 0.35g tansiyon altında asıldı. Deneysel veriler izometrik transducer ile kaydedildi. Karbamilkolin klorür (Karbakol; 50 µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde Karamel boyası olan E150d (14 mg/ml) bariz tekrarlanabilir gevşemelere neden oldu. Ayurvedik drog zerdeçal (*Curcuma longa*; 10 µl/ml), E150d ile indüklenen gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa neden oldu. E150d (14 mg/ml)'ye bağlı gevşeme cevapları nitrik oksid sentaz inhibitörü olan N^w-nitro-L-arginin (L-NOARG; 10 µM) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi. Zerdeçal (10 µl/ml), L-NOARG'ın oluşturduğu inhibisyonu tersine çevirerek E150d'ye bağlı gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldu. Na⁺/K⁺-ATPaz blokörü uvabain (10 µM) ise, E150d (14mg/ml) gevşemelerinde hafif bir azalmaya neden olurken, zerdeçal (10 µl/ml) uvabain varlığındaki gevşeme cevabını anlamlı olmayan bir şekilde artırdı. Bununla birlikte, E150d (14 mg/ml) ile indüklenen gevşeme cevapları potasyum kanal blokörü tetraetilamonyum (TEA; 50 µM) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi ve zerdeçal (10 µl/ml) bu inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde tersine çevirdi. Fakat L-tipi kalsiyum kanal blokörü verapamil (10 µM) veya ryanodin reseptör (intraselüler kalsiyum kanal) blokörü rutenyum kırmızısı (10 µM), E150d (14 mg/ml)'ye bağlı olan gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı etki oluşturmazlar. Buna benzer şekilde, zerdeçal da verapamil veya rutenyum kırmızısı varlığındaki E150d gevşemeleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmaz.

Kantitatif deneysel çalışmalarda, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanıldı. Çalışılan izole fare mide fundus dokuları ayrı guruplar halinde kontrol, zerdeçal (10 µl/ml), E150d (14mg/ml) ve zerdeçal(10µl/ml)+E150d(14mg/ml) içeren ve 37 °C'de muhafaza edilen Tyrode solüsyonlarında 40 dk inkübe edildikten sonra bu guruplarda ayrı ayrı olarak SOD, COX enzim aktiviteleri ve nitrit konsantrasyonları kantitatif olarak ELISA yöntemi ile ölçüldü. ELISA metodunun prensibi özgül antijen-antikor reaksiyonuna dayanır. Zerdeçal (10µl/ml) tek başına kullanıldığında, izole fare mide fundus dokusundaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmaz. Bunun zıttında, E150d (14mg/ml) ilgili dokudaki SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olan çok belirgin bir artışa neden oldu. E150d (14mg/ml)'nin SOD

aktivitesinde oluşturduğu bu artış zerdeçal (10µl/ml) tarafından tamamen ortadan kaldırıldı. Diğer taraftan zerdeçal, (10µl/ml) tek başına uygulandığında izole fare gastrik fundusundaki nitrit seviyesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. E150d (14mg/ml) ise ilgili dokuda nitrit konsantrasyonunda belirgin bir azalmaya neden olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Zerdeçal (10µl/ml), karamel boyasının nitrit konsantrasyonunu azaltıcı etkisini ortadan kaldıramadı. İzole fare mide fundus dokusundaki COX enzim aktivitesi üzerinde ise, zerdeçal (10µl/ml), E150d (14mg/ml) veya zerdeçal (10µl/ml)+E150d (14mg/ml) istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadı.

Sonuç olarak, deneysel veriler izole fare mide fundus şeritlerinde E150d ile indüklenen gevşeme yanıtlarında nitrerjik sistemin ve potasyum kanallarının rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca E150d'nin ilgili dokuda süperoksid anyonlarını artırmak suretiyle SOD aktivitesini artırdığını, Ayurvedik drog zerdeçalın E150d ile antioksidan olarak etkileştiğini ve E150d'ye bağlı zararlı oksidatif stresin zerdeçal ile tedavi edilebileceğini telkin etmektedir.

Anahtar Kelimeler: E150d, gastrik fundus, moleküler mekanizma, zerdeçal.

ABSTRACT

Molecular Action Mechanisms of Caramel Color and Interactions with Turmeric in Mouse Gastric Fundus

In this study, the effects of ammonium sulfite caramel color (E150d) on isolated mouse gastric fundus were investigated. In addition, the interaction of E150d with turmeric (*Curcuma longa*), an Ayurvedic drug, was analysed qualitatively and quantitatively. We used male mice (*Swiss albino*) in all experiments. After killing the mice by cervical dislocation gastric fundal tissues were isolated and placed in *Tyrode's* solution maintained at 37 °C and aerated with 95% O₂ and 5%CO₂.

In qualitative experimental studies, isolated gastric fundal strips were prepared by longitudinally and mounted under 0.35 g tension. Experimental data were recorded by an isometric transducer. E150d (14mg/ml) caused reproducible relaxations in the isolated gastric fundal strips precontracted with carbachol (carbamylcholine chloride; 50 µM). Ayurvedic drug turmeric (10 µL/ml) nonsignificantly increased the relaxations induced by E150d (14mg/ml). N^w-nitro-L-arginine (L-NOARG; 10 µM), an inhibitor of nitric oxide synthase, significantly inhibited the relaxations induced by E150d (14mg/ml) and turmeric (10 µl/ml) abolished the inhibitory action of L-NOARG and caused a significant increment on these relaxations. In contrast, ouabain (10 µM), an inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase, slightly inhibited the relaxations induced by E150d (14 mg/ml) and turmeric (10 µl/ml) nonsignificantly inhibited the effect of ouabain (10 µM) and slightly increased the relaxations induced by E150d (14mg/ml). In addition, tetraethylammonium (TEA; 50 µM), a potassium channel blocker, significantly inhibited the relaxations induced by E150d (14mg/ml). Turmeric (10µl/ml) nonsignificantly decreased the inhibitory effect of TEA and increased the relaxations induced by E150d (14mg/ml) in the related tissue. On the other hand, L-type calcium channel blocker verapamil (10 µM) or ryanodine receptor (intracellular calcium channel) blocker ruthenium red (10 µM) did not have a significant effect on relaxations induced by E150d (14mg/ml). And also, turmeric didn't affect the E150d relaxations exposed to verapamil or ruthenium red.

In quantitative experimental studies ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) method was used. Isolated gastric fundal tissues of mice were separated into groups included control, turmeric (10 µl/ml), E150d (14mg/ml) and turmeric (10µl/ml)+E150d(14mg/ml) and incubated with related compounds in *Tyrode* solution maintained at 37 °C for 40 minutes. Then SOD, COX enzyme activities and nitrite concentrations of the groups separately and quantitatively analysed by using ELISA method. The principal of ELISA method is based on specific antigen-antibody reaction. E150d (14mg/ml) significantly increased SOD activity and turmeric (10 µl/ml) completely abolished the increment of SOD activity caused by E150d. Turmeric (10µl/ml), when used alone, did not significantly affect the nitrite level in the related tissue. In contrast E150d (14mg/ml) obviously decreased the nitrite level. But this reduction was not significant. Turmeric (10µl/ml) failed to abolish this reduction induced by E150d in the related tissue. On the other hand turmeric (10µl/ml), E150d (14mg/ml) or

E150d(14mg/ml)+turmeric(10µl/ml) did not significantly affect the COX enzyme activity in the gastric fundal tissues.

In conclusion, the experimental results show that nitreergic system and potassium channels may play a role on relaxations induced by E150d in the mouse gastric fundal strips. In addition E150d may increase SOD activity by means of generating superoxide anions in the related tissue. Furthermore, Ayurvedic drug turmeric may interact with E150d as an antioxidant agent and the harmful oxidative stress of E150d may be treated by turmeric.

Key Words: E150d, gastric fundus, molecular mechanism, turmeric



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
Ca ²⁺	: Kalsiyum iyonu
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CO ₂	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz
E150a	: Karamel boyası I (Basit Karamel)
E150b	: Karamel boyası II (Alkali Sülfid Karamel)
E150c	: Karamel boyası III (Amonyak Karamel)
E150d	: Karamel boyası IV (Amonyum Sülfid Karamel)
eNOS	: Endotelial nitrik oksid sentaz
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
INS No	: International Numbering System for Food Additives
KCl	: Potasyum klorür
L-NOARG	: N ^w -nitro-L-arginin
mg	: Miligram
Mg ²⁺	: Magnezyum iyonu
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mM	: Milimolar
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
NO	: Nitrik oksid
NOS	: Nitrik oksid sentaz
O ₂	: Oksijen
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride

RIPA	: Radio-Immunoprecipitation Assay
RPM	: Round per minute
SOD	: Süperoksid dismutaz
TEA	: Tetraetilamonyum



1. GİRİŞ

Hipergliseminin diyabet hastalarında oluşan bazı komplikasyonlardaki rolü iyi bilinmektedir. (1) Diyabet hastalığında görülen inflamatuvar süreçlerde; oksidatif stres (2), ileri glikasyon son ürünleri (3), protein kinaz C aktivitesi (4) ve inflamatuvar gen aktivitelerindeki değişikliklerin (5) rol oynayabileceğine yönelik görüşler mevcuttur. Son zamanlarda, hiperglisemiye bağlı diyabetik komplikasyonlarda oksidatif stresin azaltılmasının terapötik önemi vurgulandığından, oksidatif stresi azaltan maddelere olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bunlardan özellikle doğal antioksidan tıbbi droglara yönelik bilimsel çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Örneğin, Ayurvedik (holistik (bütüncül) tedavi yaklaşımında olan Ayurveda tıbbı ile ilgili) bir drog olan zerdeçal (*Curcuma longa*), çeşitli hastalıklarda terapötik etki için uzun süredir kullanılmakta ve zerdeçala yönelik bilimsel araştırmalar dünyada gittikçe artmaktadır (6) (7) (8). Zerdeçale olan ilginin artmasında antioksidan özellik göstermesinin payı büyüktür. Nitekim son zamanlarda hiperglisemiye bağlı olan metabolik komplikasyonlarda mitokondriyal elektron transport zincirindeki aşırı süperoksid üretiminin sorumlu olabileceği ileri sürülmüş ve antioksidan etkiye sahip olan maddelerin hiperglisemiye bağlı hasarı azaltabilme potansiyeli olabileceği vurgulanmıştır (9) (10).

Hiperglisemi oluşumunda sağlıklı olan şekerli gıdaların yüksek miktarda ve sıklıkla tüketilmesinin payı yüksektir. Şekerle ilgili sağlığı tehdit eden diğer bir durum da, son zamanlarda sağlığa olan zararlarından söz edilen ve günümüzde gıda endüstrisinde dünyada yaygın bir şekilde kullanılan, şekerden imal edilen gıda boyası olan karamel boyalarıdır. Şekerin yüksek ısıda ısıtılıp eritilerek moleküler değişikliğe uğratılması yani okside edilerek yakılması ve kahverengi bir renge dönüştürülmesi işlemine *karamelizasyon*, oluşan ürüne *karamel* veya *karamelize şeker* adı verilir. Uygulanan sıcaklık kullanılan şekerin cinsine göre değişmekle birlikte yaklaşık 186 °C'de eriyerek karamel kıvamına gelen şeker oksitlenir (11). Karamel, koyu kahverengi renginde yoğun bir sıvı olup evde sofradan tavada ısıtılarak elde edilebildiği gibi gıda sektöründe değişik katalizörler kullanılarak yüksek ısı ve basınç altında da elde edilebilir. Karamel elde etmek için gıda sektöründe kullanılan karbonhidrat genellikle yüksek dekstroz içerikli mısır şurubudur. Gıda endüstrisinde katalizörler yardımıyla elde edilen karamela *karamel boyası* da denir (11). Karamel boyası gıda endüstrisinde

genellikle renk ve aroma vermek amacıyla kullanılır. Karamel boyasının besinsel bir değeri olmadığı gibi gıdayı koruyucu bir fonksiyonu da yoktur (12). Karamelin gıda endüstrisindeki kullanım alanları çok yaygın olup bunlar arasında unlu mamüller, sirke, kahvaltılık reçeller ve jöleli ürünler, şekerli ürünler, sucuk, hazır çorba imalatı, çeşni ve baharat karışımları, kaplama malzemeleri, marmelatlar, dondurmalar, kola gibi gazlı ve diğer alkolsüz hazır içecekler ve bira, viski gibi alkollü içecekler sayılabilir (13). Karamel boyası elde etme işlemleri sırasında değişik katalizörler kullanılır (14). Bu katalizörler genellikle asidik, alkali bileşikler, sülfidler veya amonyum bileşikleridir (13). Karbonhidratlar ile amonyak (sülfitlerin varlığında veya yokluğunda) kullanıldığında *Maillard* reaksiyonu oluşur ve 2 ve 4-metilimidazol (2-MI ve 4-MI)'u da içeren birçok yan ürün meydana gelir. 2-MI ve 4-MI'nin toksik ve karsinojenik (akciğer, karaciğer, tiroid kanserleri, lösemi, vb.) etkileri olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (15) (16) (17) (18) (19). Buna rağmen günümüzde 2-MI ve 4-MI içeren karamel boyaları (karamel boyası III ve IV) gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (13) (20). Karamel boyası III genellikle fırınlama, bira, soya sosu, yemek soslarında kullanılırken (14) karamel boyası IV (amonyum sülfid karamel; E150d), genellikle kolalar ve diğer alkolsüz hazır içeceklerde ve karıştırılmış (harmanlanmış) viskilerde kullanılır (13).

Karamel boyası olan E150d'nin sağlığa olan zararları bilinmekle birlikte E150d'nin gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini aydınlatmaya yönelik bilimsel bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bundan dolayı şimdiki çalışmada, E150d'nin gastrointestinal sistemde oluşturduğu etkileri ve bu etkilerde rol oynayan mekanizmaları moleküler düzeyde aydınlatmayı amaçladık. Ayrıca son zamanlarda Ayurvedik tıp gibi holistik tedavi yaklaşımlarına olan ilgi dünyada gittikçe arttığından, Ayurvedik drog olan zerdeçalın (6) (7) (8). E150d ile olan etkileşmelerini ve bu etkileşmelerin altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmanın halk sağlığına ve bu konuda yapılacak olan bilimsel çalışmalara katkı sağlayacağına inanılmaktadır.

Şimdiki çalışma, Ç.Ü. Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu'ndan alınan izinle yapılmıştır. Karamel boyası olan E150d'nin izole fare mide fundus dokusundaki etkilerini ve Ayurvedik drog zerdeçal ile olan etkileşmelerini araştırmak için, Çalışmalarda, kalitatif ve kantitatif *in vitro* deneysel farmakoloji yöntemleri kullanıldı. Kalitatif deneysel çalışmalarda, izole fare gastrik fundus

şeritlerinde E150d'nin belirgin ve tekrarlanabilir gevşeme cevapları oluşturduğu gözlemlendi. Bu gevşeme cevabının altında yatan moleküler etki mekanizmalarını ve ilgili dokuda E150d'nin zerdeçal ile olan etkileşmesini aydınlatabilmek için; nitrik oksid sentaz (NOS) enzim inhibitörü N^w-nitro-L-arginin, Na⁺/K⁺-ATPaz pompa inhibitörü uvabain, K⁺ kanal blokörü tetraetilamonyum (TEA), voltaja duyarlı L-tipi kalsiyum kanal blokörü verapamil ve intraselüler Ca²⁺ kanalları olan ryanodin reseptörlerinin blokörü rutenyum kırmızısı kullanıldı. Kantitatif deneysel çalışmalarda ise, izole fare mide fundus dokusunda karamel boyası E150d'nin etkilerini ve zerdeçal ile olan etkileşmelerini kantitatif olarak aydınlatabilmek için, ilgili dokuda E150d'nin süperoksid dismutaz (SOD), siklooksijenaz (COX) enzim aktiviteleri ve nitrit seviyesi üzerindeki etkileri ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Karamel boyası olan E150d'nin düz kasta oluşturduğu etkiyi daha önce araştıran bilimsel bir literatüre rastlanmadığından, deneysel bulgularımızı diğer E150d çalışmaları ile karşılaştıramadık. Ancak ilgili yerlerde, glukoz ile ilgili benzer çalışmalardan bahsedilmiştir.

2. GENEL BİLGİ

Şimdiki çalışmada, karamel boyası olan E150d'nin fare mide fundusundaki muhtemel etkileri ve Ayurvedik drog zerdeçal ile olan etkileşimleri araştırılmıştır. Araştırılan konular ile ilgili literatür bilgisi aşağıdaki gibidir.

2.1. Mide Anatomisi ve İnnervasyonu

GIS (gastrointestinal sistem), ağız yoluyla alınan besinlerin depolanması, sindirilmesi ve atılmasından sorumlu sistemdir. İnsanda ağız, yutak, özofagus, mide, on iki parmak barsağı, kalın barsak, karaciğer, pankreas, safra kesesi, rektum ve son olarak anüsten oluşur. Özofagus ve ince barsak arasında bir yapı olan mide, kardial, fundus, corpus ve pilor bölümlerinden oluşmaktadır. Midenin özofagusla bağlantısında kardial sfinkteri, mide – duodenum arasında ise pilor sfinkteri bulunmaktadır (21) (22).

Midenin beslenmesinde rol oynayan arterler: Çölyak trunkusundan çıkan sol gastrik arter (a. Gastrica sinistra); a. Hepatica propria'dan gelen sağ gastrik arter (a. Gastrica dextra); Gastroduodenal arterden uzanan sağ gastrik omental arter, splenik arterden uzanan sol gastrik omental arter (a. Gastro-omentalis sinistra) ve splenik arterden çıkan posterior gastrik arter (22).

Midenin venleri ise şöyledir: Vena portaya V. gastrica sinistra ve v. gastrica dekstra dökülürken; v. Lienalis bağlanan v. gastrica brevis ve v. gastro-omentalis sinistra'dır. v. mesenterika superiora dökülen ise V. gastro-omentalis dekstradır (23).

Gastrointestinal sistem; parasempatik, sempatik ve enterik sinir sistemi tarafından innerve edilir. Medulla oblongata'dan uzanan X. Kranial sinir olan Nervus Vagus siniri, parasempatik innervasyonu yönetir. Asetilkolin, Vazoaktif Intestinal Peptid, Gastrin serbestleyici peptid, P maddesi gibi nörotransmitterlerin salınımını kontrol eden parasempatik sistem, sindirimi stimule eder. Parasempatik sinir sisteminin aksine görevi genellikle gastrointestinal sistem aktivasyonunu inhibe etmek olan sempatik sinir sistemi ise, çölyak gangliyonundan uzanır. Norepinefrin, nöropeptid Y nörotransmitter maddeleri ile duvar kasını gevşetir ve salgıları azaltır (24).

Tüm gastrointestinal sinir sisteminde bulunan intrinsik sistemi (enterik sinir sistemi) aslında otonom sisteminin parçası olsa da ayrı bir refleks olarak çalışır. Miyenterik plexus (Auerbach plexusu) ve submukozal plexus (Meissner plexusu)

olmak üzere iki sinir ağından oluşur. Nörotransmitterler aracılığıyla motilite, düz kas ve sekresyonun kontrolü sağlanır. Ekstrinsik sinirler, sempatik ve parasempatik sinirler olup midenin damar ve sfinkterlerini kontrol ederler. Mide bu sinirlerden ayrıldığında aktivitesini sürdürebilir (25).

Bu araştırmada besinlerin ilk temas yeri olan midenin fundus kısmı ile çalışılmıştır.

2.2. Gıda Katkı Maddeleri

Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde yer alan Gıda katkı maddeleri ile ilgili tanım aşağıdaki gibidir:

‘Besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddelerdir’ (26).

Türk Gıda Kodeksi'ne göre gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması şöyledir:

1. Tatlandırıcılar 2. Renklendiriciler 3. Koruyucular 4. Antioksidanlar 5. Taşıyıcılar 6. Asitler 7. Asitlik düzenleyiciler 8. Topaklanmayı önleyiciler 9. Köpüklenmeyi önleyiciler 10. Hacim arttırıcılar 11. Emülgatörler 12. Emülsifiye edici tuzlar 13. Sertleştiriciler 14. Aroma arttırıcılar 15. Köpük oluşturmalar 16. Jelleştiriciler 17. Parlaticılar 18. Nem vericiler 19. Modifiye nişastalar 20. Ambalajlama gazları 21. İtici gazlar 22. Kabartıcılar 23. Metal bağlayıcılar 24. Stabilizörler 25. Kıvam arttırıcılar 26. Un işlem maddeleri 27. Kontrast arttırıcılar (26).

2.2.1. Gıda Boyaları

Gıda boyaları, gıda katkı maddeleri olarak kabul edilmekte olup Türk Gıda Kodeksi'nde ‘Renklendiriciler’ adı altında yer alırlar. Çalışmamızda, renklendirici gıda katkı maddesi olarak dünyadaki kullanımı çok yaygın olan karamel boyasını kullandık. Boya ilavesi, gıdaların üretimi veya depolama sırasında bozulmaya uğrayan renklerini homojenize ederek, canlandırarak ya da renksiz olanları renklendirerek daha çekici hale getirilmesi amacıyla yapılmaktadır. Gıda boyaları bitkisel, hayvansal veya mineral kaynaklardan ekstre veya sentez edilerek elde edilebilirler. Gıda katkı maddeleri

standartın sağlanabilmesi için uluslararası bir sistemle numaralandırılmıştır. Europe (Avrupa) sözcüğünün ilk harfi olan E ve numaralar ile tanımlanmışlardır. Boyar maddeler, E100-E199 arasında kod numarası alır (27). Renk çeşitleri ve örnekleri aşağıda belirtilmiştir.

- 1) Sarı – turuncu rengi verenler: Curcumin (E100) , Riboflavin (E101), Yellow 2G (E107), Tartrazin (E102)
- 2) Kırmızı rengi verenler: Amarant (E123), Ponceu 4R (E124), Azorubin (E122), Allura Red 4C (E129)
- 3) Mavi rengi verenler: Patent Blue V(E131), İndigotin (E132), β -karoten (E160)
- 4) Yeşil rengi verenler: Klorofil (E 140), Green S (E142), Klorofil bakır kompleksi (E141)
- 5) Kahverengi rengi verenler: Karamel (E150),
- 6) Beyaz rengi verenler: Kalsiyum Karbonat (E170), Titanyumdioksit (E171)
- 7) Siyah rengini verenler: Brilliant black BN (E151)
- 8) Metal renk verenler: Alüminyum (E173), Gümüş (E174), Altın (E175) (28)

Renklendirici gıda katkı boyaları elde edildikleri kaynaklara göre ise doğal, yarı sentetik ve sentetik olarak gruplandırılırlar. Doğal gıda boyaları, bitkisel ve hayvansal veya mikroorganizmalar tarafından sentezlenirler. Klorofil, curcumin, β -karoten vb bunlara örnektir. Yarı sentetik gıda boyaları, doğal kaynaklara çeşitli yöntemler uygulanarak üretilirler. (Örnek: klorofilin bakır kompleksi) Sentetik olanların çoğunluğunun yapısında – (N=N)- grubu bulunduğu azo boyalar olarak da adlandırılırlar. Allura Red 4C, Tartarazin, Red 2G Amarant ve Ponceau 4R bunlara örnektir. Çalışmamızda yer alan karamel boyası, doğal olarak bulunan şekerin tek başına ya da katalizörler ile (amonyum ve sodyum sülfid) muamele edilerek ısıtma işlemi uygulanmasıyla elde edilir. Karamel boyası yarı sentetik sınıfına girmektedir (29).

Gıdaların pişirme yöntemi olarak kızartma ve kavurma yöntemlerinin sıklıkla kullanılmasının sebebi, gıdaya tat, lezzet ve renk katılmasını sağlamaktır. Karamelizasyon, Maillard reaksiyonu olarak bunu sağlayan iki önemli reaksiyon vardır. Çalışmamızda kullandığımız E150d kod numaralı karamel boyası, karamelizasyon, yani şekerin amonyum ve sodyum sülfid varlığında ısıtılmasıyla elde edilir (30).

2.2.2. Karamel Boyası

Karbonhidratların (dekstroz, invert şeker, laktoz, malt şurubu, hidroliz nişasta ve sakkaroz) ısıtılarak erime derecesine getirilmesinin ardından, ısıtılmaya devam edilerek sarıdan başlayarak amber rengine ve sonunda kahverengi renk almasına ve yeni aroma kazanmasına karamelizasyon denir. Glikoz ve fruktozdan oluşan, sofr şeker olarak da bilinen sakkaroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) yaklaşık 180-190 °C’de erimeye başlar 210 °C’de karamel kıvamına gelir. Karamel tadını veren diasetil bu aşamada oluşmuş olur (31). Karamel boyası hamur işlerinde, kahvede, reçelde, çeşitli soslarda (nar ekşisi, soya sosu, barbekü sos), asitli içeceklerde, birada, viskide, yer fıstığında hatta kozmetikte sıklıkla kullanılmaktadır. Elde edilme yöntemlerine göre 4 sınıfa ayrılır.

Sınıf I: Basit Karamel; INS No.E150a

Sınıf II: Alkali Sülfıt Karamel; INS No.E150b

Sınıf III: Amonyak Karamel; INS No.E150c

Sınıf IV: Amonyum Sülfıt (veya Sülfıt-Amonyak) Karamel; INS No.E150d (32).

Sınıf I-basit karamel; oluşumunda amonyum ya da sülfıt kullanılmamaktadır. E150a daha çok viski ve soslarda kullanılırlar. Sınıf II-alkali sülfıt karamel (E150b) ; sülfıt varlığında amonyaksız olarak oluşturulur ve genellikle kanyak, viski ve çaylara ilave edilir. Sınıf III-amonyak karamel (E150c); soya sosu ve bira yapımında kullanılmak üzere; sülfıt bileşikleri olmadan sadece amonyak varlığında oluşturulur. Sınıf IV-amonyum-sülfıt karamel (E150d) ise sülfıt bileşikleri ve amonyak varlığında oluşturulur ve daha çok baharat karışımlar, çerezler, tatlandırıcılar, alkolsüz içecekler ve kola yapımında kullanılır (14). En çok renk verme özelliğine sahip olması sebebiyle ticari olarak en çok kullanılan Amonyum-Sülfıt karamel (E150d) dir (33).

Karbonhidratlar ile amonyak (sülfıtlarin varlığında veya yokluğunda) kullanıldığında karamelizasyon reaksiyonu oluşur ve 2 ve 4-metilimidazol (2-MI ve 4-MI) da içeren birçok sayıda yan ürün meydana gelir. Bu yan ürünler, metilglioksal ve amonyum bileşiklerinin reaksiyona girmesiyle oluşur. 2-MI ve 4-MI’nin toksik ve karsinogenik etkileri olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (15). 2- ve 4-Metilimidazol; basit karamel ve alkali sülfıt karmelde bulunmazken, amonyum bileşiklerinin

bulunduğu sınıf III ve sınıf IV karamel boyalarında bulunmaktadır. Bunun yanı sıra Maillard reaksiyonu sırasında 4- MI oluşmaktadır (33).

2.3. Zerdeçal (*Curcuma longa*)

Zerdeçal, *Zingiberaceae* familyasından *Curcuma longa* bitkisi olup halk arasında Hint Safranı, Safran kökü, Zerdeçöp, Sarıboya olarak da bilinir. Başta Hindistan, Endonezya ve Malezya olmak üzere Güney Asya'da ve Afrika'da bulunur. 1 metre boyuna ulaşabilen çok yıllık otsu bir bitkidir. Beslenme, hastalıklardan korunma ve tedavi için zerdeçalın rizomları yani köksap denilen toprak altı kısımları (*Curcuma longae rhizoma*) kullanılmaktadır (34). Zerdeçal, halk arasında baharat olarak tek başına kullanıldığı gibi baharat karışımlarında da yer alır. Güney Asya'da sıklıkla tüketilen köri, sarı rengini karışımında yer alan zerdeçaldan almaktadır. Zerdeçal gıda olarak tüketildiği gibi verdiği yoğun sarı renkten ötürü gıda boyası (peynirler, soslar, kekler, alkollü içecekler, bisküviler vb.) ve tekstil boyası olarak da kullanılmaktadır (35).

Zerdeçala sarı-turuncu rengi veren polifenolik yapıdaki bileşik kurkumindir. Kurkumin ilk kez 200 yıl önce izole edilmiş, molekül yapısı olan *diferuloylmethane* ise 1910 yılında tanımlanmıştır. Geleneksel Hint Tıbbı olan Ayurveda'da ise gastrointestinal sistem rahatsızlıkları, karaciğer ve akciğer hastalıkları, hematolojik bozukluklar ve cilt hastalıklarında zerdeçal rizomları olduğu gibi tıbbi bitki olarak tedavi edici etkiyi elde etmek için yüzyıllardır kullanılmaktadır (36). Halk ilacı olarak günümüzde zerdeçalın kökü doğal haliyle kaynatılarak kullanıldığı için şimdiki çalışmamızda zerdeçalın gastrointestinal sistem üzerindeki etkisini araştırmak için bizler de zerdeçal rizomunu aynı şekilde hazırlayarak kullandık. Zerdeçalın etken maddesi olan kurkuminin birçok hipotetik molekül hedefi modüle ederek anti-oksidan, anti-inflamatuvar, analjezik, antiseptik, antifungal etkilerinin olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda anti-kanser özelliği üzerine çalışmalar da yapılmaktadır. Meme, prostat, pankreas, akciğer kanseri tedavilerinde güvenilir oluşuyla ilgili çalışmalar devam etmektedir (37). Ayrıca, zerdeçalın *Alzheimer* hastalığının tedavisine yeni bir yaklaşım kazandırabileceği düşünülmektedir (38).

2.3.1. Zerdeçal (*Curcuma longa*) Kimyasal Bileşenleri

Zerdeçal (*Curcuma longa*) rizomlarında biyolojik olarak aktif, parlak sarı renkte, polifenolik yapıda curcuminoidler bulunmaktadır. Bunlar; curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) %60–70 oranında bulunurken, demethoxycurcumin (1-(4-hydroxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione) %20–27 oranında ve bisdemethoxycurcumin (1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3, 5-dione), %10–15 oranında bulunur (39) (40). Ayrıca A, E vitamini, β -karoten ve C vitamini, B₁, B₂, B₃, B₆ ve B₉ vitaminleri ile indirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) da bulundurulur (41).

2.4. Ayurvedik Tıp

Sanskritçe bir kelime olan *Ayurveda*, Yaşam Bilgisi/Bilimi anlamına gelmektedir. Bilinen ilk yazılı metinlerden olan ve saf bilgi anlamına gelen Veda'ların, binlerce yıllık bir geçmişe sahip oldukları bilinmektedir (35). *Ayurveda*, yaşamın her alanında mükemmel gelişmeyi amaçlar. Sağlıklı ve uzun yaşamın sırlarını veren Ayurvedik Tıp, holistik (bütüncül) bir tıp sistemi olup evrensel ve her zaman geçerli olan prensiplere sahiptir. Bundan dolayı Ayurveda 'Zamansız Bilim' olarak da adlandırılır. Ayurveda'nın binlerce yıl önce Hindistan'da doğmuş ve nesilden nesile aktarılmış olduğuna inanılır. Ayurveda'nın etkileri sadece Asya kıtasındaki tıbbı değil, Eski Mısır ve Yunan tıbbında da görülmektedir. Hindistan'ın sömürge altında kaldığı uzun süre boyunca baskılanarak bilgilerin kaybolması tehdidiyle karşı karşıya kalmıştır. Hindistan'ın 1947'de bağımsızlığını kazanmasının ardından kurulan çeşitli derneklerle eski metinler bir araya getirilmiş ve Ayurveda'ya verilen önem artmıştır (42). Bazı çevrelerce tartışma konusu olsa da Ayurveda'nın güvenli ve etkin bir tedavi sağladığı birçok bilimsel çalışmayla kanıtlanmıştır (43) (44). Günümüzde yaygın olarak kullanılan medikal tedavilerin; radikal tedaviden çok semptomatik tedavi yaklaşımında olmaları, yan etkilerinin fazla oluşu ve nispeten pahalı olmaları nedeniyle Ayurvedik tıba olan ilgi gittikçe artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde doğal tedaviye olan ilgi gün geçtikçe arttığından, ilaç firmaları ürünlerini bitkisel ürünlerden yana arttırmaktadır.

Dünya'da Ayurvedik Tıp eğitimi sistemli bir şekilde verilmekte olup, 6 yıla yakın bilimsel bir eğitim programını kapsamaktadır. Temel eğitimden sonra Ayurvedik Tıbbın; pediatri, göz bilimi, geriatri, kulak-burun-boğaz, genel tıp ve cerrahi, jinekoloji

ve doğum dalı, toksikoloji, psikiyatri ve psikoterapi, dahili tıp olmak üzere birçok ihtisas alanı mevcuttur. Çalışmamızda kullandığımız zerdeçal önemli etkilere sahip Ayurvedik bir drog olup her beden tipine hitap eder (45) (46).

2.5. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Ajanlar ile İlgili Literatür Bilgisi

Verapamil: Voltaja duyarlı L-tipi kalsiyum kanallarının selektif blokörüdür (47).

Rutenyum kırmızısı (Rutenyum red): İntraselüler kalsiyum kanalları olan ryanodin reseptörlerini bloke eder (48).

Uvabain: Na^+/K^+ -ATPaz pompasını inhibe eden kısa etki süreli bir kalp glikozididir (47).

N^w-nitro-L-arginin: Nitrik oksid sentaz (NOS) enzim inhibitörüdür. NOS'u inhibe ederek endojen nitrik oksid (NO) cevaplarını ortadan kaldırır (49).

Tetraetilamonyum: Nonselektif potasyum kanal blokörüdür (50).

Karbamilkolin (karbakol): Asetilkolin benzeri, parasempatomimetik etkili bir bileşik olup mide düz kasında kasılmaya yol açar (51).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada 20-25 gram ağırlığındaki *Swiss albino* türü erkek fareler kullanıldı. Servikal dislokasyonla öldürüldükten sonra farelerin mideleri izole edilerek Tyrode (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 0.2 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM D-glukoz) solüsyonu içeren, 37 °C sıcaklıkta muhafaza edilen ve %95 O₂+%5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan ortama alındı. Çalışmadaki *in vitro* kalitatif ve kantitatif deneylerin detayları aşağıdaki gibidir.

3.1. *İn vitro* Kalitatif Deneysel Çalışmalar

İzole edilen fare mide fundus dokuları longitudinal olarak kesilmek suretiyle ikiye bölündü ve 0.35g tonus altında organ banyolarına asıldı. Organ banyoları 37°C'de muhafaza edilmekte olup, %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile deney boyunca gazlandırıldı. Asılan dokuların dengelenmesi için 40 dakika inkübe edildi ve 15 dk'lık aralarla dokular taze Tyrode solüsyonu ile yıkandı. Cevaplar izometrik transdüsör (Harvard ve May FDT O.5 MP35) ile bilgisayar donanımlı farmakolojik veri analiz sistemi (BIOPAC, MP35)'ne kaydedildi. Kalitatif olan tüm deneylerin başlangıcında bu işlem tekrar edildi.

3.1.1. E150d Kontrol Deneyleri

40 dakikalık inkübasyon periyodundan sonra bazal tonus 5 dakika boyunca bilgisayara kaydedildi. Daha sonra banyo ortamına mikropipet yardımıyla sonuç konsantrasyonu 50µM olacak şekilde karbakol 50 µl uygulanarak kasılma cevabı elde edildi. Karbakole bağlı kasılma cevabı platoya ulaşınca E150d 50 µl uygulandı (banyodaki sonuç konsantrasyon 14mg/ml) ve gevşeme cevabı izlendi. Maximum gevşeme cevabı gözlemlendikten sonra doku yeni hazırlanmış Tyrode solüsyonu ile yıkandı ve 40 dk.'lık inkübasyon periyodundan sonra E150d (14mg/ml) uygulaması aynı şekilde iki kez daha tekrar edilerek karamel kontrol deneyleri tamamlandı.

3.1.2. Zerdeçal Kontrol Deneyleri

Dinlenme periyodundan sonra izole fare gastrik fundus dokusunun bazal tonusu 5 dakika boyunca BIOPAC MP35 sistemine kayıt edildi. 5 ml'lik banyo ortamında

sonuç konsantrasyonu 50µM olacak şekilde karbakol mikropipet yardımıyla 50µl uygulandı. Oluşan kasılma cevabı platoya ulaştığında, banyo ortamına 50µl E150d (banyodaki sonuç konsantrasyon 14mg/ml) uygulanarak mide fundus şeritlerinde gevşeme cevabı oluşturuldu. Gevşeme cevabının maximuma ulaşması sonrası doku taze *Tyrode* solüsyonu ile yıkanmak suretiyle birinci uygulama tamamlandı. Daha sonra zerdeçal (10µl/ml) banyo ortamına ilave edilerek 40 dk inkübe edildi ve deneyin ikinci uygulaması yapıldı. Aynı şekilde üçüncü uygulama da yine aynı konsantrasyondaki zerdeçal varlığında yapılarak zerdeçal kontrol deneyleri tamamlandı.

3.1.3. N^w-nitro-L-arginin'in Uygulandığı Deneyler

İzole edilerek banyo ortamına asılan fare mide fundus şeritleri 40 dk dengeleşmeye bırakıldı. Daha sonra dokuların bazal tonusu 5 dk boyunca bilgisayara kaydedildi. 5 ml'lik banyo ortamında sonuç konsantrasyonu 50µM olacak şekilde karbakol mikropipet yardımıyla 50µl uygulandı. Oluşan kasılma cevabı platoya ulaştığında, banyo ortamına 50µl E150d (banyodaki sonuç konsantrasyon 14mg/ml) uygulanarak mide fundus şeritlerinde gevşeme cevabı oluşturuldu. Gevşeme cevabı maximuma ulaştıktan sonra dokular taze *Tyrode* solüsyonu ile yıkandı ve sonuç konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde nitrik oksid sentaz (NOS) enziminin nonselektif inhibitörü olan N^w-nitro-L-arginin (L-NOARG) banyo ortamına uygulanarak 40 dk'lık inkübasyona bırakıldı. Daha sonra L-NOARG varlığında birinci uygulama tekrar edilmek suretiyle ikinci uygulama elde edildi. İkinci uygulamanın sonunda taze *Tyrode* solüsyonu ile dokular yıkandıktan sonra L-NOARG (10µM) ve zerdeçal (10µl/ml) banyo ortamına uygulandı ve 40 dakikalık inkübasyondan sonra üçüncü uygulama yapıldı.

3.1.4. Uvabain'in Uygulandığı Deneyler

İzole edilerek banyo ortamına asılan fare mide fundus şeritleri 40 dk dengeleşmeye bırakıldı. Daha sonra dokuların bazal tonusu 5 dk boyunca bilgisayara kaydedildi, ardından 5 ml'lik banyo ortamında sonuç konsantrasyonu 50µM olacak şekilde karbakol mikropipet yardımıyla 50µl uygulandı. Oluşan kasılma cevabı platoya ulaştığında, banyo ortamına 50µl E150d (banyodaki sonuç konsantrasyon 14mg/ml) uygulanarak mide fundus şeritlerinde gevşeme cevabı oluşturuldu. Gevşeme cevabı

maximuma ulaştıktan sonra dokular taze *Tyrode* solusyonu ile yıkandı ve sonuç konsantrasyonu 10 μM olacak şekilde $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz pompa inhibitörü olan Uvabain banyo ortamına uygulanarak 40 dk inkübe edildi. Daha sonra Uvabain varlığında birinci uygulama tekrar edilmek suretiyle ikinci uygulama elde edildi. İkinci uygulamanın sonunda taze *Tyrode* solusyonu ile dokular yıkandıktan sonra Uvabain (10 μM) ve zerdeçal (10 $\mu\text{l/ml}$) varlığında dokular 40 dk inkübe edildi ve üçüncü uygulama yapıldı.

3.1.5. Tetraetilamonyum'un Uygulandığı Deneyler

İzole edilerek banyo ortamına asılan fare mide fundus şeritleri 40 dk dengeleşmeye bırakıldı. Daha sonra dokuların bazal tonusu 5 dk boyunca bilgisayara kaydedildi, ardından 5 ml'lik banyo ortamında sonuç konsantrasyonu 50 μM olacak şekilde karbakol mikropipet yardımıyla 50 μl uygulandı. Oluşan kasılma cevabı platoya ulaştığında, banyo ortamına 50 μl E150d (banyodaki sonuç konsantrasyon 14mg/ml) uygulanarak mide fundus şeritlerinde gevşeme cevabı oluşturuldu. Gevşeme cevabı maximuma ulaştıktan sonra dokular taze *Tyrode* solusyonu ile yıkandı ve sonuç konsantrasyonu 10 μM olacak şekilde nonselektif potasyum kanal blokörü olan TEA banyo ortamına uygulanarak 40 dk inkübe edildi. Daha sonra TEA (10 μM) varlığında birinci uygulama tekrar edilmek suretiyle ikinci uygulama elde edildi. İkinci uygulamanın sonunda taze *Tyrode* solusyonu ile dokular yıkandıktan sonra TEA (10 μM) ve zerdeçal (10 $\mu\text{l/ml}$) varlığında üçüncü uygulama yapıldı.

3.1.6. Verapamil'in Uygulandığı Deneyler

İzole edilerek banyo ortamına asılan fare mide fundus şeritleri 40 dk dengeleşmeye bırakıldı. Daha sonra dokuların bazal tonusu 5 dk boyunca bilgisayara kaydedildi, ardından 5 ml'lik banyo ortamında sonuç konsantrasyonu 50 μM olacak şekilde karbakol mikropipet yardımıyla 50 μl uygulandı. Oluşan kasılma cevabı platoya ulaştığında, banyo ortamına 50 μl E150d (banyodaki sonuç konsantrasyon 14mg/ml) uygulanarak mide fundus şeritlerinde gevşeme cevabı oluşturuldu. Gevşeme cevabı maximuma ulaştıktan sonra dokular taze *Tyrode* solusyonu ile yıkandı ve sonuç konsantrasyonu 10 μM olacak şekilde L-tipi kalsiyum kanallarının selektif blokörü olan verapamil banyo ortamına uygulanarak 40 dk'lık inkübasyona bırakıldı. Daha sonra verapamil varlığında birinci uygulama tekrar edilmek suretiyle ikinci uygulama elde

edildi. İkinci uygulamanın sonunda taze *Tyrode* solusyonu ile dokular yıkandıktan sonra 10 μ M verapamil ve zerdeçal (10 μ l/ml) varlığında 40 dk inkübe edildi sonrasında üçüncü uygulama yapıldı.

3.1.7. Rutenyum Kırmızısı'nın Uygulandığı Deneyler

İzole edilerek banyo ortamına asılan fare mide fundus şeritleri 40 dk dengeleşmeye bırakıldı. Daha sonra dokuların bazal tonusu 5 dk boyunca bilgisayara kaydedildi. 5 ml'lik banyo ortamında sonuç konsantrasyonu 50 μ M olacak şekilde karbakol mikropipet yardımıyla 50 μ l uygulandı. Oluşan kasılma cevabı platoya ulaştığında, banyo ortamına 50 μ l E150d (banyodaki sonuç konsantrasyon 14mg/ml) uygulanarak mide fundus şeritlerinde gevşeme cevabı oluşturuldu. Gevşeme cevabı maximuma ulaştıktan sonra dokular taze *Tyrode* solusyonu ile yıkandı ve sonuç konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde ryanodin reseptör blokörü rutenyum kırmızısı banyo ortamına 50 μ l ilave edilerek 40 dk'lık inkübasyona bırakıldı. Daha sonra rutenyum kırmızı varlığında birinci uygulama tekrar edilmek suretiyle ikinci uygulama elde edildi. İkinci uygulamanın sonunda taze *Tyrode* solusyonu ile dokular yıkandıktan sonra rutenyum kırmızısı (10 μ M) ve zerdeçal (10 μ l/ml) banyoya eklenip 40 dk inkübe edildi ve bu ajanların varlığında üçüncü uygulama yapıldı.

3.2. *İn vitro* Kantitatif Deneysel Çalışmalar

Kantitatif deneysel çalışmalarda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanıldı. Kullanılan ELISA kitleri; fare mide fundus dokularında süperoksid dismutaz (SOD), siklooksijenaz (COX) enzim aktivitelerini ve nitrit konsantrasyonunu tayin kitleri idi. Her bir ELISA kiti için 4 ayrı grup oluşturuldu. Bu gruplar sırasıyla kontrol (zerdeçal ve E150d içermeyen) gurubu, zerdeçal (10 μ l/ml) gurubu, E150d (14mg/ml) gurubu ve zerdeçal(10 μ l/ml)+E150d (14mg/ml) gurubu. Her bir gruptaki fare mide fundus dokuları izole edilir edilmez 37 °C'de muhafaza edilen, %95O₂+%5CO₂ ile gazlandırılan ve guruba göre ilgili ajanların *Tyrode* solüsyonuna eklenmiş olduğu ortamlarda 40 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra dokular sıvı azot ile muamele edilerek derin dondurucuda -80 °C'de muhafaza edildi. ELISA ile ilgili deneylerde kitlerin protokolleri uygulanmadan önce belirtilen şekilde hazırlanan ve -80 C'de muhaza edilen dokular homojenize edildi.

Homojenizasyonda; ependorf içinde -80°C' de muhafaza ettiğimiz dokuların üzerine gram başına 3ml RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer, 30µl PMSF (phenylmethylsulfonil fluoride), 30µl sodyum vanadat, 30µl proteaz inhibitör kokteyl eklenerek yüksek frekanslı titreşim oluşturarak dokuları parçalayan ultrasonik homojenizatör (Bandelin Ultrasonic Homogeniser) kullanılarak homojenatlar elde edildi (Isınmayı önlemek için homojenizasyon işlemi buzlu ortamda yapıldı ve ultrasonik homojenizatör kısa aralıklarla çalıştırıldı.) Homojenatlar 15.000 RPM'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon işleminden sonra ependorflardaki alttaki pelletler (çökeltiler) atıldı. Üstte bulunan süpernatantlar (sıvı kısımlar) ise ELISA deneylerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

ELISA deneylerinde, homojenizasyon suretiyle elde edilen ve -80 °C'de muhafaza edilen doku süpernatantları kullanıldı. SOD, COX enzim aktiviteleri ve nitrit konsantrasyon tayinleri ile ilgili ELISA deney prosedürleri her kit için farklı olup ilgili kitlerde belirtilen protokollere göre yapıldı. Deneysel sonuçların okunması ELISA microplate okuyucu (Rayto) ile yapıldı. ELISA deneylerindeki prensip kullanılan bütün kitler ve deneysel guruplar için geçerli olup özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyona dayanır.

3.3. Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Solüsyonlar

Kalitatif deneylerde kullanılmak üzere: N^w-Nitro-L-arginin, Verapamil hydrochloride ve Ouabain (Uvabain) Sigma firmasından, Tetraethylammonium chloride (TEA) ve Ruthenium Red (Rutenyum kırmızısı) ChemCruz firmasından satın alındı.

Kantitatif deneylerde kullanılmak üzere: Superoxide Dismutase Assay Kit ve Cyclooxygenase (COX) Activity Assay Kit Cayman Chemical'den satın alındı. Ultrasensitive Colorimetric Assay for Nitric Oxide Synthase (NOS) Oxford Biomedical Research'den satın alındı. Homojenizasyon için kullanılan sodyum ortovanadat ve phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) Sigma firmasından satın alındı.

Karamel boyası (E150d) Alfasol firmasından ve zerdeçal aktardan temin edildi.

3.3.1. Zerdeçal (*Curcuma longa*) Rizomu Ekstresi'nin Hazırlanması

Deneylerde kullanılan zerdeçal (*Curcuma longa*) rizomu ekstresi, geleneksel halk yönteminde olduğu gibi dekoksiyon yöntemi kullanılarak hazırlandı. Ekstrenin hazırlanmasına yönelik detaylı bilgi aşağıdaki gibidir:

Cam cezve içerisine 125 ml distile su ve 62 g zerdeçal (*Curcuma longa*) rizomları eklendikten sonra kapağı kapatılarak düşük ateşte 15 dk süre ile kaynatıldı ve ateş kapatılarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra ilgili ekstre 10 katlı gazlı bez ile süzüldü ve ependorflara tek deneye yetecek miktarda süzölmüş zerdeçal ekstresi eklendikten sonra ependorflar kapatılıp parafilm ile sarıldı ve -80 °C'lik derin dondurucuda kullanılıncaya kadar muhafaza edildi. Her zerdeçal deneyi için derin dondurucudan zerdeçal ekstresi içeren 1 ependorf alınarak kullanıldı. Böylece bütün zerdeçal deneylerinde aynı zerdeçal ekstresi taze ve standart bir şekilde kullanılmış oldu.

Hazırlanan zerdeçal ekstresinin konsantrasyonu ile ilgili olarak; 5 ml'lik organ banyosuna 50 µl zerdeçal ekstresi kullanıldı. Deneylerde kullanılan zerdeçal ekstresinin nihai konsantrasyonu 10 µl/ml'dir.

3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Kalitatif Deneylerde sonuçları değerlendirmek için; bilgisayar donanımlı farmakolojik veri analiz sistemi (BSOPAC, MP35) programında her uygulama için, plato seviyesindeki karbakol kasılma ve karamel boyası (E150d)'nın gevşeme cevabı mg olarak ölçülerek % gevşeme cevabı hesaplandı. Kantitatif deneylerde ise kitlerde belirtilen protokol ve hesaplamalar sonucundaki değerler kullanıldı.

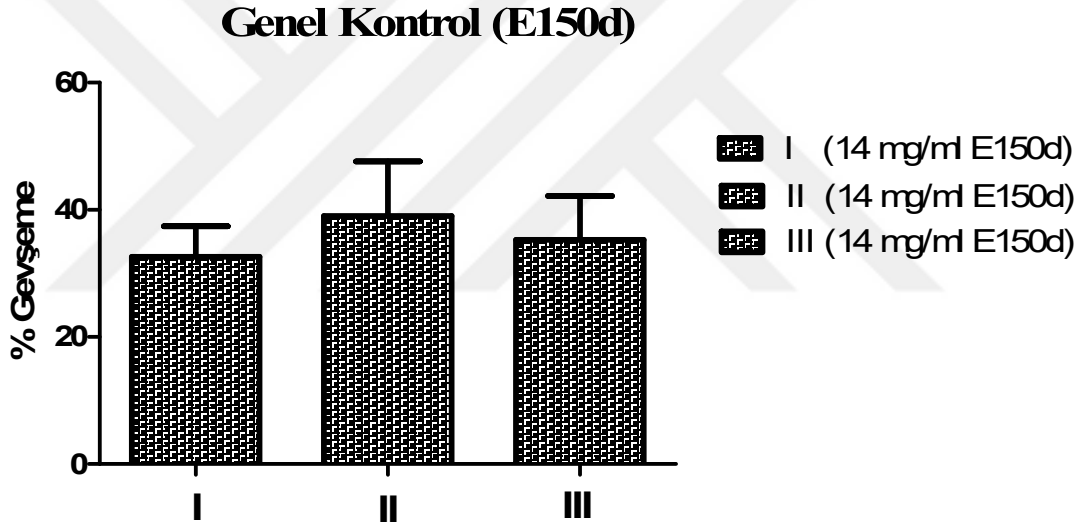
Bütün deneysel çalışma verileri tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA; posthoc: *Bonferroni*) ile değerlendirildi. 0.05'den küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. *İn vitro* Kalitatif Deney Bulguları

4.1.1. E150d Kontrol Deneylerinin Bulguları

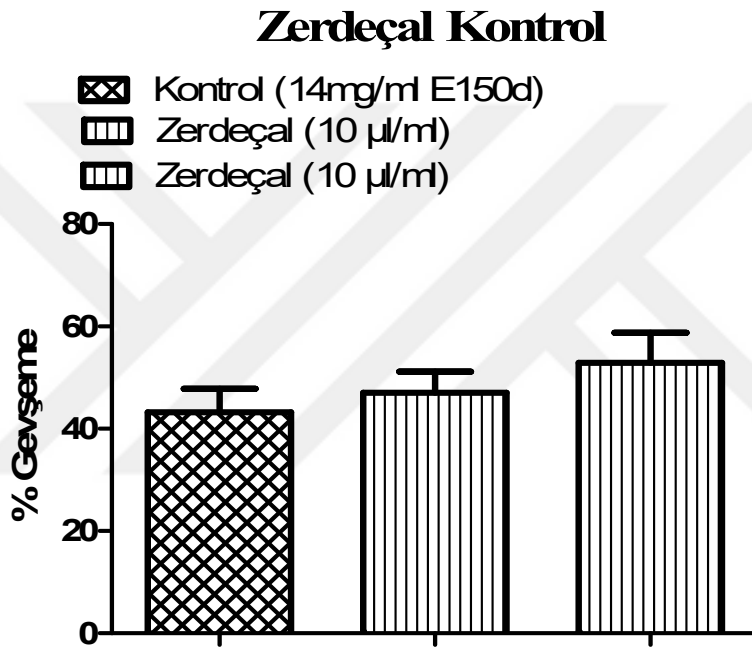
Kontrol grubunda, prekontrakte izole fare gastrik fundusunda karamel boyası (14mg/ml) ile oluşturulan gevşeme cevapları 3 kez oluşturuldu. Deneysel veriler (%gevşeme değerleri) sırası ile: 32.64 ± 4.76 ; 39.05 ± 8.57 ve 35.30 ± 6.86 idi ($n=8$). Karamel boyası ile oluşturulan gevşeme cevapları (%Gevşeme) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($P>0.05$) (Şekil 1).



Şekil 1. Karbakol (50 μ M) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) ile oluşturulan gevşeme cevapları.

4.1.2. Zerdeçal Kontrol Deneylerinin Bulguları

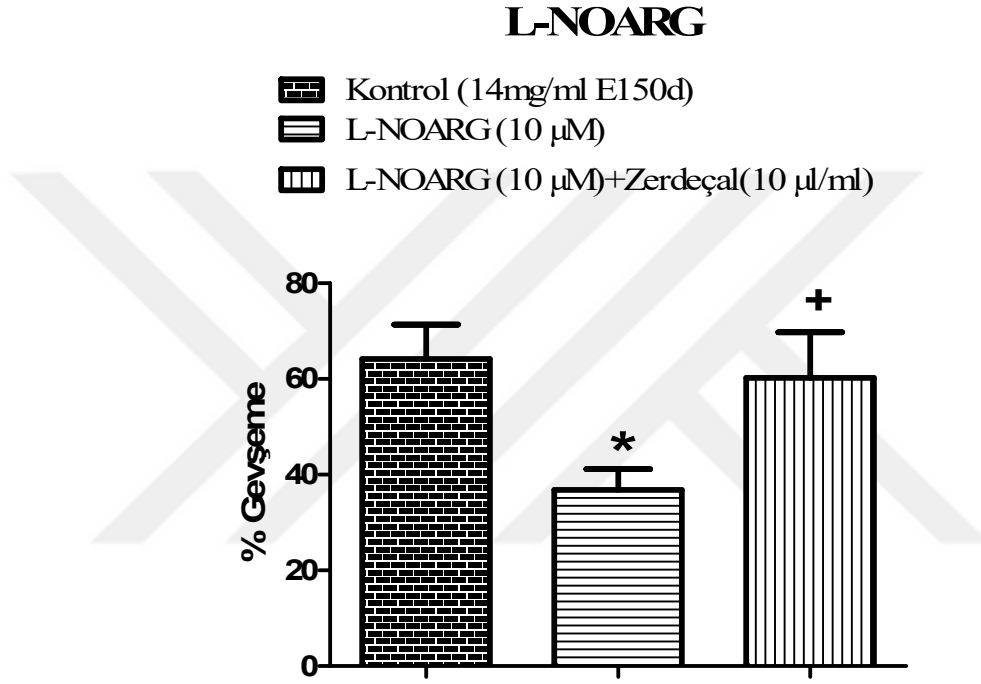
Ayurvedik bir drog olan zerdeçal (*Curcuma longa*; 10 µl/ml), karamel boyası ile indüklenen gevşeme cevaplarında bir miktar artışa neden oldu. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). Deneysel veriler (%gevşeme değerleri) sırası ile: Kontrol (Zerdeçal yokluğundaki E150d gevşemesi): 43.26 ± 4.58 ve Zerdeçal varlığındaki birinci ve ikinci E150d gevşeme cevapları sırası ile: 47.03 ± 4.11 ve 52.91 ± 5.84 idi ($n=8$) Gevşeme cevapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($P<0.005$)(Şekil 2).



Şekil 2. Karbakol (50µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde zerdeçal (10µl/ml)'in etkisi

4.1.3. N^w-nitro-L- Arginin Deneylerinin Bulguları

Karamel boyası ile indüklenen gevşeme cevapları (64.16 ± 7.17), nitrik oksid sentaz inhibitörü olan N^w - nitro-L-arginin (L-NOARG; 10 μ M) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi (36.82 ± 4.37) ($P < 0.05$). Zerdeçal (10 μ l/ml), L-NOARG'ın oluşturduğu inhibisyonu tersine çevirerek karamel boyası ile indüklenen gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa (60.21 ± 9.59) neden oldu ($P < 0.05$) (Şekil 3).

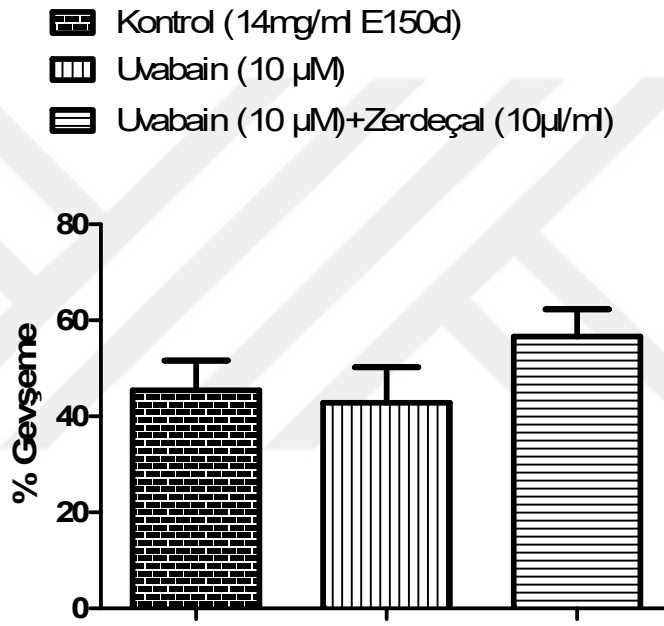


Şekil 3. Karbakol (50 μ M) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde L-NOARG (10 μ M) ve L-NOARG (10 μ M)+Zerdeçal (10 μ l/ml)'ın etkileri. *: Kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($P < 0.05$). +: L-NOARG gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($P < 0.05$).

4.1.4. Uvabain Deneylerinin Bulguları

İzole fare mide fundus şeritlerindeki karamel boyası (14 mg/ml) gevşemelerinde (45.44 ± 6.17) uvabain ($10 \mu\text{M}$), istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmaya (42.85 ± 7.35) neden olurken, zerdeçal ($10 \mu\text{l/ml}$) ilgili gevşemelerde bir miktar artışa neden oldu (56.6 ± 5.66). Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P < 0.05$)($n=8$) (Şekil 4).

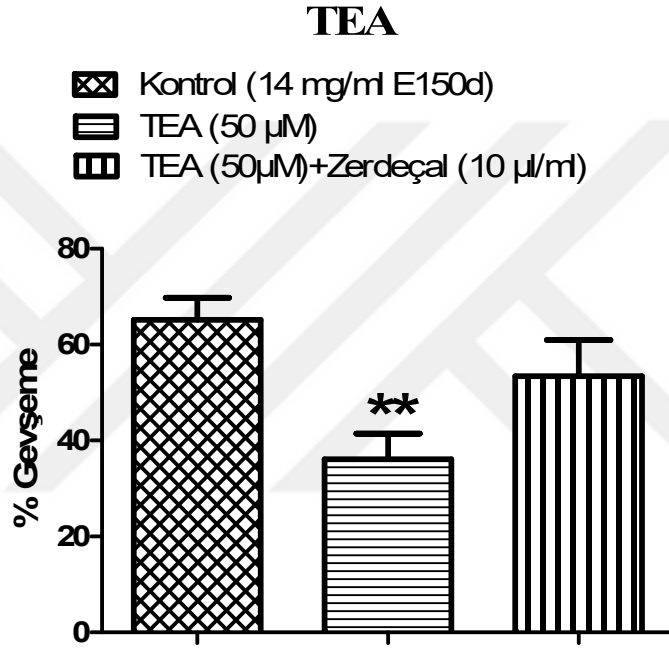
Uvabain



Şekil 4. Karbakol ($50 \mu\text{M}$) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde uvabain ($10 \mu\text{M}$) ve uvabain($10 \mu\text{M}$)+zerdeçal ($10 \mu\text{l/ml}$)’ın etkileri.

4.1.5. Tetraetilamonyum Deneylerinin Bulguları

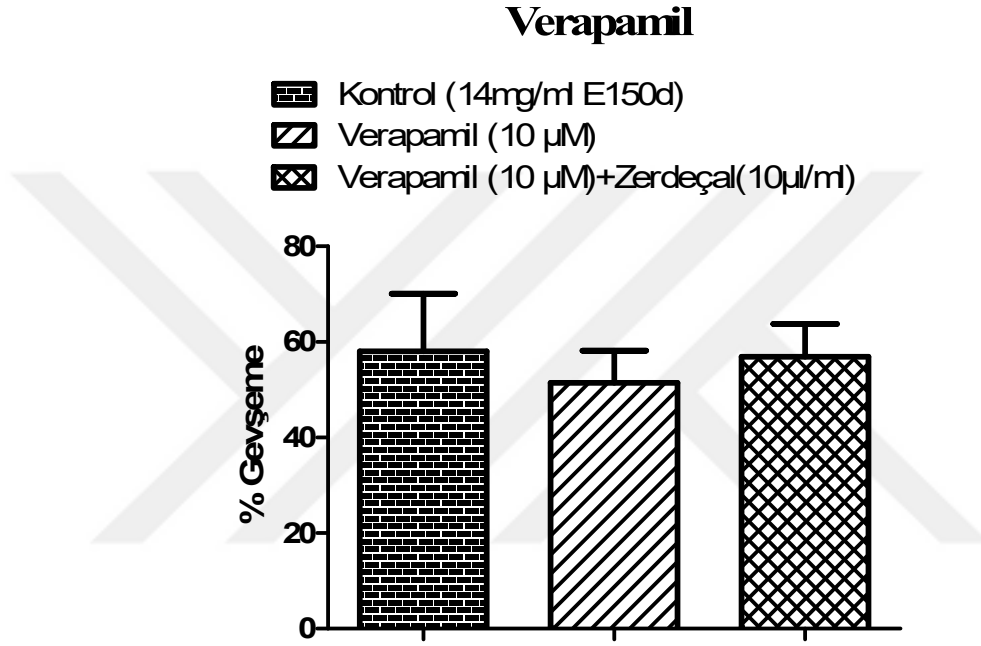
Karbakol (50 μ M) ile prekontrakte edilmiş olan izole fare gastrik fundus striplerinde E150d (14mg/ml) ile indüklenen gevşeme cevapları (65.17 ± 4.60) potasyum kanal blokörü olan tetraetilamonyum (TEA; 50 μ M) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi (36.08 ± 5.38) ($P < 0.01$). Zerdeçal (10 μ l/ml) bu inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde tersine çevirdi (53.44 ± 7.49) ($n=9$) (Şekil 5).



Şekil 5. Karbakol (50 μ M) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde TEA (50 μ M) ve TEA (10 μ M)+Zerdeçal (10 μ l/ml)'ın etkileri. **: Kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($P < 0.01$).

4.1.6. Verapamil Deneylerinin Bulguları

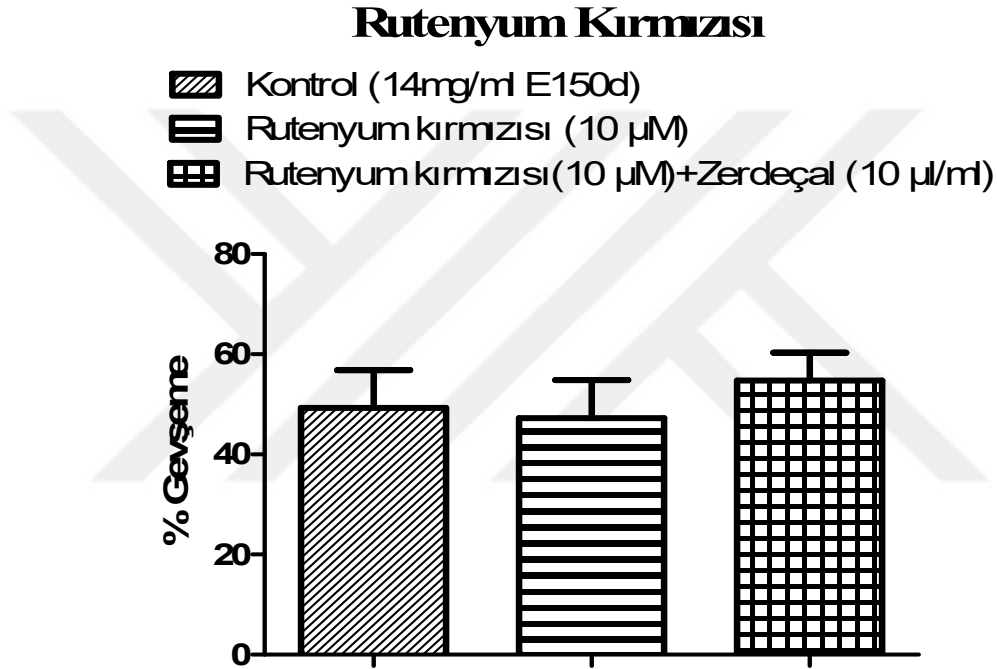
İzole fare mide fundus striplerinde karamel boyası (14 mg/ml)'a bağlı gevşeme yanıtları (58.02 ± 12.06) L-tipi kalsiyum kanal blokörü verapamil ($10 \mu\text{M}$) tarafından istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde inhibe edildi (51.40 ± 6.75). Zerdeçal ($10 \mu\text{l/ml}$) ise verapamil varlığındaki karamel boyası gevşemelerinde hafif bir artışa neden olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (56.87 ± 6.92) (Şekil 6).



Şekil 6. Karbakol ($50 \mu\text{M}$) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde verapamil ($10 \mu\text{M}$) ve verapamil($10 \mu\text{M}$)+zerdeçal ($10 \mu\text{l/ml}$)'ın etkileri

4.1.7. Rutenyum Kırmızı Deneylerinin Bulguları

Ryanodin reseptör blokörü rutenyum kırmızısı (10 μ M), karbakol (50 μ M) ile önkastırma yapılmış olan izole fare mide fundus şeritlerindeki E150d (14 mg/ml) gevşeme cevabında (49.31 ± 7.53 ; n=8) istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi (47.26 ± 7.57 ; n=8). Zerdeçal, rutenyum kırmızısı varlığındaki karamel boyası gevşemelerinde hafif bir artışa neden olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (54.75 ± 5.54 ; n=8) (Şekil 7).

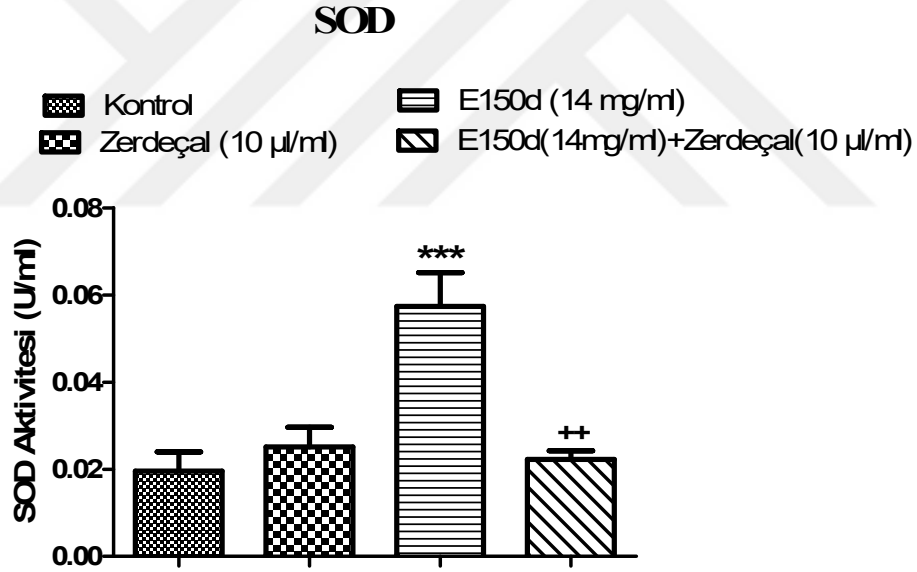


Şekil 7. Karbakol (50 μ M) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) gevşemeleri üzerinde rutenyum kırmızısı (10 μ M) ve rutenyum kırmızısı(10 μ M)+zerdeçal (10 μ l/ml)'in etkileri.

4.2. *İn vitro* Kantitatif Deney Bulguları

4.2.1. Superoksid Dismutaz (SOD) Deney Bulguları

İzole fare mide fundus dokusunda zerdeçal (10µl/ml), tek başına kullanıldığında süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinde kontrol gurubu (0.019 ± 0.004) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadi (0.025 ± 0.004). Bununla birlikte, karamel boyası (KB; E150d; 14mg/ml) ilgili dokudaki SOD aktivitesinde çok belirgin bir artışa neden oldu (0.057 ± 0.007) ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0.001$). Buna ilave olarak, karamel boyasının SOD aktivitesinde oluşturduğu bu artış zerdeçal (10µl/ml) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi (0.022 ± 0.002) ($P < 0.01$). Başka bir deyişle, zerdeçal E150d'ye bağlı olan süperoksid artışını tamamen ortadan kaldırdı (Şekil 8).

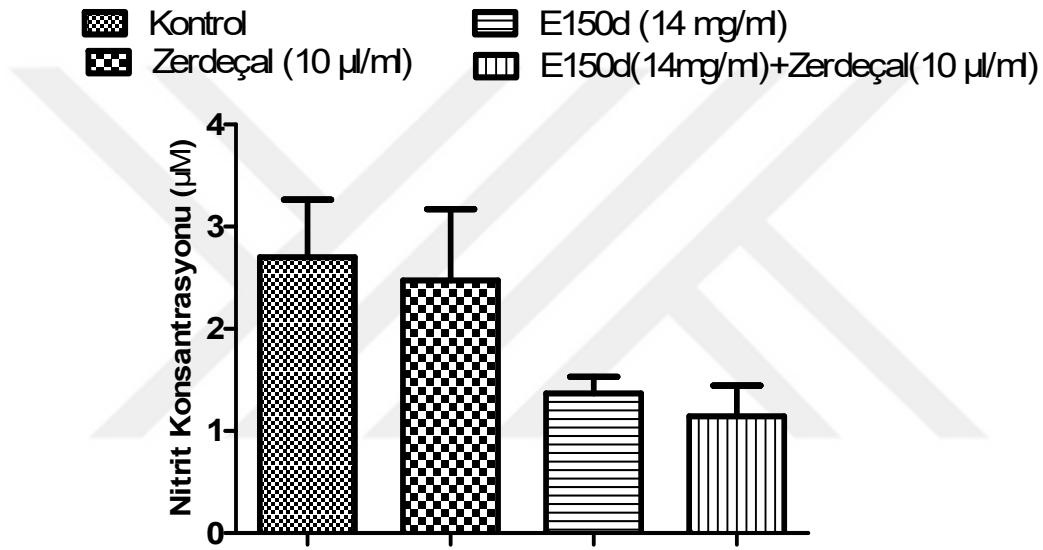


Şekil 8. İzole fare mide fundus dokularındaki SOD enzim aktivitesi üzerinde zerdeçal(10µl/ml, E150d (14mg/ml) ve zerdeçal(10µl/ml)+E150d(14mg/ml)'nin etkileri. ***: Kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($P < 0.001$). ++: E150d gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($P < 0.01$).

4.2.2. Nitrit Seviyesi Deney Bulguları

İzole fare mide fundus dokusundaki nitrit seviyesi (2.700 ± 0.565) üzerinde zerdeçal ($10 \mu\text{l/ml}$) istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (2.473 ± 0.698). Karamel boyası (E150d; 14mg/ml) ise ilgili dokuda nitrit konsantrasyonunda belirgin bir azalmaya neden olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (1.367 ± 0.164) (Şekil 9). Zerdeçal ($10 \mu\text{l/ml}$), karamel boyasının bu etkisi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (1.147 ± 0.296) (Şekil 9).

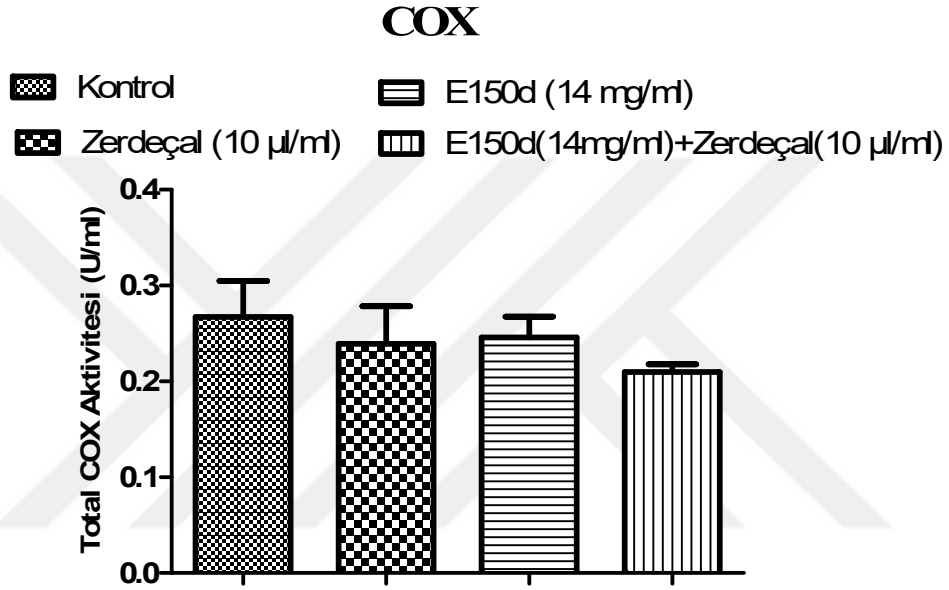
Nitrit



Şekil 9. İzole fare mide fundus dokularındaki nitrit seviyesi üzerinde zerdeçal($10 \mu\text{l/ml}$), E150d (14mg/ml) ve zerdeçal($10 \mu\text{l/ml}$)+E150d(14mg/ml)’nin etkileri.

4.2.3. Siklooksijenaz (COX) Deney Bulguları

İzole fare mide fundus dokusundaki total siklooksijenaz (COX) aktivitesi (0.267 ± 0.037) üzerinde zerdeçal (0.239 ± 0.039), karamel boyası (14mg/ml; 0.246 ± 0.021) ve zerdeçal(10 μ l/ml)+karamel boyası(14mg/ml)(0.209 ± 0.008) istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmادılar (Şekil 10).



Şekil 10. İzole fare mide fundus dokularındaki COX enzim aktivitesi üzerinde zerdeçal(10 μ l/ml, E150d (14mg/ml) ve zerdeçal(10 μ l/ml)+E150d(14mg/ml)'nin etkileri.

5. TARTIŞMA

Şimdiki çalışmada, karamel boyası olan E150d'nin izole fare gastrik fundus üzerindeki etkileri ve Ayurvedik drog zerdeçal ile olan etkileşimleri dünyada ilk olarak araştırıldı. Bu araştırmanın yapılmasındaki amaç, E150d'nin gıdalarda, özellikle hazır yiyecek ve içeceklerde, tüm dünyada yaygın olarak kullanılması ve gerek kendisinin oksitlenmiş şeker olması gerekse içerdiği metilimidazol gibi maddelerden dolayı halk sağlığını ilgilendirdiği içindir. Ayrıca Ayurvedik drog zerdeçalın antioksidan etkilerine olan ilginin son zamanlarda artmasından dolayı E150d ile zerdeçal arasındaki etkileşimleri incelemenin halk sağlığı açısından potansiyel fayda sağlayacağına inanılmaktadır. Zerdeçalın etkisi araştırılırken kullanılan zerdeçal ekstresinin halk tarafından geleneksel olarak kullanıldığı gibi hazırlanmasına özen gösterildi. Bu şekilde hazırlanan zerdeçal rizomları, gerek B₁, B₃ ve B₉ vitaminleri ve gerekse glutatyon bakımından iyi bir kaynak olduğu ve içerdiği fenolik ve flavonoid miktarları açısından değerlendirildiğinde güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu (52) için ve bu çalışmanın halkın kullandığı şekliyle, halk sağlığındaki etkisini aydınlatmak da amaçlarımız arasında yer aldığından, zerdeçal ekstresinin halk arasında kullanıldığı şekli ile hazırlanmasına özen gösterildi. Çalışmamızda ayrıca, insana benzerlik açısından sıcak kanlı ve memeli olduğu için denek olarak fare kullanılması tercih edildi. Hormonal değişimlerden dişiler kadar etkilenmediği ve dolayısı ile denekler arasında daha iyi bir standardizasyon yakalayabilmek için erkek fare cinsi ile çalışıldı. Ayrıca, besinlerle direkt olarak etkileşen kısım olduğu için çalışmada düz kas yapısındaki fare mide fundusunun kullanılması tercih edildi. Karamel boyası olan E150d'nin düz kasta oluşturduğu farmakolojik etkiyi araştıran bilimsel bir literatüre şimdiye kadar rastlayamadığımızdan, ilgili yerlerde, glukoz ile ilgili benzer çalışmalardan bahsedilmiştir.

Zerdeçal, *Curcuma longa* adlı zerdeçal bitkisinin toprakaltı gövde kısımları olan rizomları yüzyıllardır Asya ülkelerinde kullanılmakta olan bitkisel tıbbi bir drogtur (53). İlgili drogun toksisitesi düşük olup antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Uzun süredir zerdeçal ve zerdeçalın etken maddesi olan kurkumin üzerinde birçok bilimsel çalışma yapılmakta olup Ayurvedik tıp gibi doğal, holistik tedavi yaklaşımlarına olan ilgi gün geçtikçe arttığından son zamanlarda bu konuda yapılan

bilimsel çalışmalar gittikçe artmaktadır. Örneğin Fang ve arkadaşları tarafından sıçan torasik aortasında yapılmış olan bir çalışmada (2009), zerdeçalın etken maddesi olan kurkumin'in yüksek glukoz (44 mmol/L) ile indüklenen akut vasküler endotel disfonksiyonu üzerinde terapötik etki sağladığı rapor edilmiştir. İlgili çalışmada, asetilkolin (ACh) ile gevşetilen endotelyumlu sıçan torasik aorta ringleri yüksek glukoz (44mmol/L) varlığında 2 saat inkübe edildiğinde ACh gevşemelerinin inhibe olduğu ve kurkumin (10^{-11} mol/L)'in bu inhibisyonu ortadan kaldırdığı rapor edilmiştir (53). Diyabetteki vasküler endotel hücre disfonksiyonunda hiperglisemi ile indüklenen intra-ve ekstraselüler glikasyonda oksidanların aşırı üretiminin ve yüksek glukoz ile indüklenen serbest radikallerin rol oynadığı rapor edilmiş (54) (55), zerdeçal ve kurkuminin ise antioksidan etki göstererek hiperglisemiye bağlı olan oksidatif strese karşı hücreleri korudukları bildirilmiştir (56) (57) (58).

Kalitatif çalışmalarımızda, prekontrakte izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14mg/ml) ile indüklenen gevşeme cevapları, nitrik oksid sentaz enzim inhibitörü olan N^w-nitro-L-arginin (L-NOARG; 10 µM) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi. Zerdeçal (10 µl/ml), L-NOARG'ın oluşturduğu inhibisyonu tersine çevirerek L-NOARG (10 µM) varlığındaki E150d (14mg/ml) gevşeme cevabında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldu. Bu arada, NOS inhibitörü olan L-NOARG'ın E150d gevşemesinde inhibisyon oluşturması, ilgili dokuda karamel boyası olan E150d'nin oluşturduğu gevşeme cevabında nitrik oksidin rol oynadığını göstermektedir. Ayurvedik drog zerdeçalın ilgili dokuda L-NOARG'ın oluşturduğu inhibisyonu ortadan kaldırarak ilgili gevşeme yanıtlarında bir artış, yani kontrol gurubuna benzer bir cevap oluşturması, L-NOARG'ın NOS üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırdığını ve NOS'un kontrol gurubunda olduğu gibi aktive olarak NO sentezlediğini telkin etmektedir. Zerdeçalın L-NOARG üzerindeki bu etkisinin altında yatan mekanizma, zerdeçalın antioksidan özelliğinden ve/veya başka bir mekanizmadan kaynaklanmış olabilir. Bunu aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

İzole fare mide fundus dokusunda nitrerjik sistem ile ilgili olan kantitatif deneylerde ise ilgili dokuda nitrit konsantrasyonu ölçüldü. Kullanılan kitte nitrat redüktaz enzimi bulunduğundan, NOS vasıtası ile oluşan NO'dan nitrat ve nitrit oluşurken kitteki nitrat redüktaz vasıtası ile oluşan nitratin tamamı nitrite

dönüştürülmektedir. Çalışmada, zerdeçal tek başına uygulandığında fare gastrik fundusundaki nitrit seviyesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadi. Karamel boyası E150d (14mg/ml) ise ilgili dokuda nitrit konsantrasyonunda belirgin bir azalmaya neden olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Zerdeçal (10µl/ml), karamel boyasının nitrit konsantrasyonunu azaltıcı etkisini ortadan kaldıramadı. Bu kantitatif deneysel veriler, izole fare mide fundus dokusunda E150d'nin NOS enzim aktivitesini azaltabileceği düşüncesini akla getirir de, kalitatif çalışmalarımızda E150d'nin ilgili düz kasta oluşturduğu gevşeme yanıtlarında nitrik oksid sentaz aktivitesinin rol oynadığı kullanılan NOS inhibitörü L-NOARG ile teyit edildiği için, kantitatif çalışmalarımızdaki E150d'ye bağlı nitrit azalmasının nedeninin NOS'dan değil de NO'dan kaynaklanmış olabileceği kanaatindeyiz. Başka bir deyişle, E150d'nin indüklediği süperoksid anyonları NOS tarafından sentezlenen NO'nun stabilitesini azaltarak sonuçta oluşan nitrit miktarında azalmaya neden olmuş olabilir. Yüksek glukoz ile yapılan bazı benzer çalışmalar bizim bu hipotezimizi destekler niteliktedir. Örneğin Hoshiyama ve arkadaşları insan glomerular endotel hücrelerinde yapmış oldukları bir çalışmada (2003), yüksek glukoz (60 mM) seviyesinin eNOS protein ekspresyonunu artırırken nitrit seviyesini konsantrasyona ve zamana bağımlı bir şekilde azalttığını ve sonuçta NO üretiminin suprese olduğunu gözlemlemişler ve ortama L-arginin veya SOD'un ilave edilmesinin NO azalmasını engellediğini göstermişlerdir. Yazarlar bu bulgulara dayanarak, diyabetik nefropatisi olan hastaların tedavisinde L-arginin alımının veya antioksidan alımının NO restorasyonuna katkı sağlayabileceğini ileri sürmüşlerdir (59). Buna benzer şekilde yapılmış olan diğer çalışmalarda; nitrik oksid biyoyararlanımındaki azalma (60), L-arginin eksikliği (61) veya süperoksid üretimine bağlı NO inaktivasyonundaki artış (62) hiperglisemide meydana gelen nitrerjik sistemle ilgili bozukluğun nedenleri arasında gösterilmiştir. Diğer taraftan, Derubertis ve Craven, hipergliseminin proteinkinaz C (PKC)'yi aktive etmek suretiyle oksidatif stresi artırdığını ve bunun glukotoksisitede önemli bir yolak olduğunu ileri sürmüşlerdir (63). Brodsky ve arkadaşları ise, süperoksid anyonu gibi serbest oksijen radikalleri arttığı zaman bunların nitrik oksidi yakalayarak peroksinitrit oluşturduğunu rapor etmişlerdir (64). Buna ilave olarak, yüksek konsantrasyondaki D-glukoz (60 mM)'un oksidatif stresi artırdığı ve bunun da nitrik oksid stabilitesini azalttığı ileri sürülmüştür (59). Bu görüşü destekleyen

diğer bir çalışma Craven ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (65). İlgili çalışmada, diyabetik sıçanlardaki glomerüllerde nitrik oksid stabilitesinde ve salıverilmesinde azalma meydana geldiği rapor edilmiş ve yüksek glukoz ortamında serbest oksijen radikali üretiminin mekanizması olarak da glukoz otooksidasyonu gösterilmiştir (65). Abid ve arkadaşları tarafından endotel hücreler üzerinde yapılan diğer bir çalışmada (2001) ise, endotel disfonksiyonunda endojen nitrik oksidin süperoksid anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmalarının rolü olduğu ve SOD'un süperoksid anyonunu yakalayarak peroksinitrit oluşumunu engellemesinin NO biyoaktivitesini artırdığı bildirilmiştir (66). Çalışmamızda kullandığımız karamel boyası, glukozun ısıtılarak oksitlenmesi ile elde edilmektedir (11). Bundan dolayı, çalışmamızda gözlemlediğimiz benzer bulgular yazarların önerdiği mekanizmalardan kaynaklanmış olabilir. Başka bir deyişle, çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, E150d'nin nitrit konsantrasyonunu azaltıcı meylinde E150d ile indüklenen süperoksid üretimine bağlı NO inaktivasyonundaki artışın rol oynayabileceği düşünülmektedir. E150d'nin ilgili dokuda nitrit seviyesini kontrol gurubuna göre belirgin bir şekilde azaltsa da bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmamasının ve bu inhibitör etkinin antioksidan olan zerdeçal tarafından engellenememesinin muhtemel nedeni, kullanılan E150d ve zerdeçal konsantrasyonlarının düşük olmasından kaynaklanmış olabilir.

İzole fare mide fundus şeritlerinde karamel boyası olan E150d (14mg/ml)'ye bağlı gevşeme cevabında Na^+/K^+ -ATPaz pompasının spesifik blokörü olan uvabain (10 μM ; 40 dk inkübasyon), hafif bir azalmaya neden olurken zerdeçal uvabain (10 μM) varlığındaki E150d gevşeme cevabında artışa neden oldu. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Deneysel bulgular, izole fare mide fundusunda E150d ile indüklenen gevşeme cevaplarında Na^+/K^+ -ATPaz pompasının rol oynamadığını telkin etmektedir. Yüksek glukozun Na^+/K^+ -ATPaz'ı nasıl etkilediği ile ilgili olarak yapılan bilimsel çalışmalarda, glukoz konsantrasyonunun ve glukoz maruz kalma süresinin etkide kritik öneme sahip olabileceği vurgulanmıştır. Bu konuda Yamashita ve arkadaşlarının sığır aortik endotel hücre kültüründe yapmış oldukları bir çalışmada (1992), ilgili hücre kültürlerinin, glukoz (100 mg/dl) ve mannitol (300 mg/dl) ile inkübasyonunun Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde değişiklik oluşturmadığı ancak daha yüksek konsantrasyondaki glukoz (400 mg/dl) ile uzun süre (96 saat) inkübasyonun Na^+/K^+ -ATPaz pompasını inhibe edebileceği ileri sürülmüştür (67). Ayrıca, diyabetik

komplifikasyonda rol oynayan önemli bir mekanizmanın Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde meydana gelen azalma olduğu bildirilmiştir (67). Diyabetik hiperglisemide hücrede birikmiş olan glukozun aktif aldoz redüktaz tarafından sorbitole dönüştürüldüğü ve hücrede artan sorbitolün de Na^+/K^+ -ATPaz pompa aktivitesini azaltabileceği ileri sürülmüştür (67). Benzer şekilde, yüksek konsantrasyondaki glukoz ile 5 gün süre ile muamele edilen retina endotel hücre kültüründe intraselüler sorbitol seviyesinde artış ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir (68).

Karbakol ile prekontrakte edilmiş olan izole fare gastrik fundus striplerinde E150d ile indüklenen gevşeme cevabı potasyum kanal blokörü tetraetilamonyum tarafından bariz bir şekilde inhibe edildi ve bu inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı idi. Ayurvedik drog zerdeçal ise TEA inhibisyonunu belirgin bir şekilde engellemekle birlikte zerdeçalın bu etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgular, fare mide fundusunda karamel boyası ile indüklenen gevşeme cevaplarında potasyum kanallarının rol oynayabileceğini göstermektedir. Glukoz ile ilgili yapılan bazı bilimsel çalışmalar potasyum kanallarının glukoz metabolizması üzerindeki etkisini aydınlatmaya yöneliktir. Örneğin Ashcroft, tarafından yapılmış olan bir çalışma (2007), K_{ATP} kanallarının glukoz homeostazındaki rolünü aydınlatmaya yönelik olup pankreatik beta hücrelerindeki K_{ATP} kanallarında meydana gelebilen bir mutasyonun insülin salıverme miktarını etkileyebileceği ve neonatal diyabet, konjenital hiperinsülinizm gibi hastalıklarda rol oynayabileceği rapor edilmiştir (69). Buna ilave olarak, Mc Donald ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (2007), rodentlerde ve insanlarda K_{ATP} kanallarının glukoz homeostazında önemli bir role sahip olduğu bildirmiştir (70). Henquin (2009)'e göre; plazma glukoz seviyesi düştüğü zaman metabolik inhibisyon K_{ATP} kanallarını açar ve böylece elektriksel aktivite ve insülin salıverilmesi suprese olur. Metabolik aktivasyon ise K_{ATP} kanallarını kapatır. Sonuçta membranal depolarizasyon, voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının açılması, Ca^{++} influsu ve insulin sekresyonu olur (71).

İzole fare mide fundus striplerinde karamel boyası olan E150d ile indüklenen gevşeme yanıtı L-tipi kalsiyum kanal blokörü olan verapamil (10 μM) tarafından istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde hafifçe azaltıldı. Ayurvedik drog zerdeçal ise verapamil varlığındaki E150d'ye bağlı gevşeme cevabında anlamlı olmayan hafif bir artışa neden oldu. Başka bir deyişle, verapamil ve zerdeçal E150d'ye bağlı

gevşeme cevaplarını etkilemediler. Deneysel veriler, izole fare mide fundusunda E150d ile indüklenen gevşeme cevaplarında L-tipi kalsiyum kanallarının rol oynamadığını telkin etmektedir. İntraselüler kalsiyum kanalları olan ryanodin reseptörleri ile ilgili olan çalışma sonuçları da L-tipi kalsiyum kanalları ile ilgili olan deneysel sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Ryanodin reseptörleri ile ilgili deneylerde, ryanodin reseptör blokörü olan rutenyum kırmızısı fare mide fundus striplerindeki E150d'ye bağlı gevşeme yanıtında hafif bir azalmaya neden olmakla birlikte bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Zerdeçal ise rutenyum kırmızısı varlığındaki E150d gevşemelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artışa neden oldu. Ryanodin reseptörleri ile ilgili deney sonuçları, L-tipi kalsiyum kanalları gibi ryanodin reseptörlerinin de karamel boyası E150d ile indüklenen gevşemelerde rol oynamadığını telkin etmektedir. Bu konuda yapılan benzer çalışmalara literatürde rastlanmamıştır.

Kantitatif çalışmamızda, izole fare mide fundus dokusunda zerdeçal tek başına uygulandığında, ilgili dokudaki süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadi. Bunun zıttında, karamel boyası E150d ilgili dokudaki SOD aktivitesinde çok belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldu. E150d'nin SOD aktivitesinde oluşturduğu bu artış zerdeçal tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi. Başka bir deyişle, zerdeçal E150d'ye bağlı olan SOD aktivitesindeki artışı %100'e yakın bir şekilde ortadan kaldırdı. Deneysel veriler, izole fare gastrik fundus dokusunda karamel boyası olan E150d'nin süperoksid anyon radikali oluşturmak suretiyle ilgili dokudaki SOD'u uyardığını ve SOD aktivitesinde yüksek bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Buna ilave olarak, E150d tarafından arttırılan süperoksid anyon radikallerinin antioksidan Ayurvedik drog olan zerdeçal tarafından inhibe edilmek suretiyle SOD aktivitesinin azaltıldığını telkin etmektedir. Bizim bu hipotezimiz Angelova ve arkadaşları tarafından yapılan ve glukozun SOD aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışma (1995) ile desteklenmektedir. İlgili çalışmada Angelova ve arkadaşları, glukozun SOD üzerindeki etkisinde glukoz molekülünün değil de glukozun indüklediği süperoksid anyonlarının SOD aktivitesinde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir (72). Bu konuda yapılmış olan başka bir çalışmada ise, yüksek konsantrasyondaki D-glukozun serbest oksijen radikallerini oluşturmada otooksidasyonun rolü telkin edilmiştir (65). Artmış olan serbest radikaller ya serbest

oksijen radikallerinin artmasından veya serbest oksijen radikallerini yakalayan sistemin bozulmasından veya her iki durumdan kaynaklanmış olabileceği rapor edilmiştir (65).

İzole fare mide fundus dokusunda, zerdeçal (10µl/ml), E150d (14mg/ml) veya zerdeçal (10µl/ml)+E150d (14mg/ml) grupları COX enzim aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmalar. Bu deneysel veriler, fare fundus dokusunda E150d'nin COX enzim aktivitesi üzerinde bir etkisi olmadığını telkin etmektedir. Oysa ki yüksek glukoz ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda yüksek glukozun veya hipergliseminin COX enzim aktivitesini artırmak suretiyle inflamasyon oluşturabildiği bildirilmiştir (73) (74) (75) (76). Bizim çalışmamızda, karamel boyası olan E150d'nin COX enzim aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamasının nedeni; kullanılan karamel konsantrasyonunun yeterli olmaması ve/veya ilgili dokunun E150d'ye maruz kalma süresinin yeterli olmamasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, karamel, oksitlenmiş şeker (11) olduğundan, bunun oluşturduğu moleküler etki farklı olabilir. Bunun aydınlatılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Yüksek glukoz ortamında inflamatuvar süreçlerin nasıl etkilendiği ile ilgili bazı çalışmalar literatürde bulunmakla birlikte glukozun yüksek ısıda yakılması ile oluşan glukoz oksidasyon ürünü (11) karamelin potansiyel inflamatuvar etkilerini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Yüksek seviyedeki glukoz total süperoksid dismutaz (COX) enzim aktivitesini etkilerken ilgili enzimin alttiplerini birbirinden farklı olarak etkiler. Bilindiği gibi siklooksijenazlar (COX-1 ve COX-2) prostaglandinlerin sentezini katalize ederler (13) (17). Bu enzimlerden COX-1 çoğu hücrelerde eksprese edilir ve bazı hücre ve dokularda bazal fizyolojik fonksiyonlarda rol oynar. COX-2 ise çoğu hücrede çok düşük seviyede eksprese edilmekle birlikte lipopolisakkarit, interlökin, vb. inflamatuvar ajanların etkisi ile yüksek miktarda eksprese edilir (77) (78). Kiritoshi ve arkadaşlarının insan mesangial hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada (2003), yüksek konsantrasyondaki glukoz (30 mmol/L)'un COX-2 ekspresyonunu artırdığını ve bunda mitokondrial reaktif oksijen türlerinin rol oynayabileceğini telkin etmişlerdir (75). Yapılan başka bir çalışmada ise, hipergliseminin, prostaglandin/tromboksan dengesini tromboksan lehine bozabildiği gösterilmiştir (74). Ayrıca diyabetik hastalarda da normal sağlıklı insanlara göre COX-2 upregülasyonu olduğu bildirilmiştir (73). Cosentino ve arkadaşlarının insan endotel hücrelerinde yapmış oldukları bir çalışmada (2003) ise, yüksek glukoz

seviyesinin (22.2 mmol/L) protein kinaz C (PKC) signalingi vasıtasıyla oksidatif stresi indüklediği, COX-2'yi upregüle ettiği ve NO seviyesini azalttığı telkin edilmiştir (76).

Özet olarak, karbakol ile aktif tonüs oluşturulan izole fare gastrik fundusunda yapılan kalitatif çalışmalara göre; karamel boyası olan E50d ile indüklenen gevşeme cevapları üzerinde uvabain, verapamil, ve rutenyum kırmızısı istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmaz iken, L-NOARG ve TEA E150d'ye bağlı gevşeme yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiler. Ayurvedik drog zerdeçal ise L-NOARG 'ın oluşturduğu E150d gevşemeleri üzerindeki inhibisyonu tamamiyle ortadan kaldırdı. Kantitatif çalışmalarda ise, E150d'nin süperoksid dismutaz enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı ve zerdeçalın bu artışı tamamiyle ortadan kaldırdığı görülmektedir.

DeneySEL veriler, izole fare mide fundus dokusunda karamel boyası olan E150d ile indüklenen gevşeme cevaplarında nitrik oksid sentaz enzim aktivasyonunun ve potasyum kanallarının rol oynadığını telkin etmektedir. Ayrıca karamel boyası olan E150d'nin izole fare mide fundus dokusunda oksitleyici bir ajan gibi davranarak süperoksid anyon radikali oluşumunu artırmak suretiyle SOD aktivitesini artırdığını, Ayurvedik drog zerdeçalın ise yine ilgili dokuda antioksidan etki ile süperoksid anyon radikallerini azaltmak suretiyle SOD aktivitesini azalttığını telkin etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, amonyum sülfid karamel boyası (E150d)'nın izole fare mide fundusu üzerindeki etkileri araştırıldı. Buna ilave olarak, Ayurvedik drog olan zerdeçalın E150d ile olan etkileşimleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. Bütün deneylerde erkek fareler (*Swiss albino*) kullanıldı. Fareler servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra gastrik fundus izole edilerek içinde *Tyrode* solüsyonu bulunan, 37 °C'de muhafaza edilen ve %95 O₂+%5CO₂ ile havalandırılan ortamlarda muhafaza edildi.

Kalitatif deneysel çalışmalarda gastrik fundus şeritleri longitudinal olarak hazırlandı ve organ banyosuna 0.5g tansiyon altında asıldı. Deneysel veriler izometrik transducer ile kaydedildi. Karbamilkolin klorür (Karbakol; 50 µM) ile önkastırma yapılan izole fare mide fundus şeritlerinde E150d (14 mg/ml) bariz tekrarlanabilir gevşemelere neden oldu. Ayurvedik drog zerdeçal (*Curcuma longa*; 10 µl/ml), E150d ile indüklenen gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa neden oldu. E150d (14 mg/ml)'ye bağlı gevşeme cevapları nitrik oksid sentaz inhibitörü olan N^w-nitro-L-arginin (L-NOARG; 10 µM) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi. Zerdeçal (10 µl/ml), L-NOARG'ın oluşturduğu inhibisyonu tersine çevirerek E150d'ye bağlı gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldu. Na⁺/K⁺-ATPaz'ın spesifik blokörü uvabain (10 µM), E150d (14mg/ml) gevşemelerinde hafif bir azalmaya neden olurken, zerdeçal (10 µl/ml) uvabain varlığındaki gevşeme cevabını anlamlı olmayan bir şekilde artırdı. E150d (14 mg/ml) ile indüklenen gevşeme cevapları potasyum kanal blokörü tetraetilamonyum (TEA; 50 µM) tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edildi ve zerdeçal (10 µl/ml) bu inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde tersine çevirdi. L-tipi kalsiyum kanal blokörü verapamil (10 µM) veya ryanodin reseptör (intraselüler kalsiyum kanal) blokörü rutenyum kırmızısı (10 µM), E150d (14 mg/ml)'ye bağlı olan gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı etki oluşturmazlar. Zerdeçal da verapamil veya rutenyum kırmızısı varlığındaki E150d gevşemeleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmaz.

Kantitatif deneysel çalışmalarda, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanıldı. Çalışılan izole fare mide fundus dokuları ayrı guruplar

halinde kontrol, zerdeçal (10 µl/ml), E150d (14mg/ml) ve zerdeçal(10µl/ml)+E150d(14mg/ml) içeren ve 37 °C’de muhafaza edilen *Tyrod*e solüsyonlarında 40 dk inkübe edildikten sonra bu guruplarda ayrı ayrı olarak SOD, COX enzim aktiviteleri ve nitrit konsantrasyonları kantitatif olarak ELISA yöntemi ile ölçüldü. ELISA metodunun prensibi özgül antijen-antikor reaksiyonuna dayanır. Zerdeçal (10µl/ml) tek başına kullanıldığında, izole fare mide fundus dokusundaki süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinde kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Bunun zıttında E150d (14mg/ml) ilgili dokudaki SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olan çok belirgin bir artışa neden oldu. Karamel boyasının SOD aktivitesinde oluşturduğu bu artış zerdeçal (10µl/ml) tarafından tamamen ortadan kaldırıldı. Zerdeçal (10µl/ml) tek başına uygulandığında izole fare gastrik fundusundaki nitrit seviyesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Karamel boyası E150d (14mg/ml) ise ilgili dokuda nitrit konsantrasyonunda belirgin bir azalmaya neden olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Zerdeçal (10µl/ml), karamel boyasının nitrit konsantrasyonunu azaltıcı etkisini ortadan kaldıramadı. Diğer taraftan, izole fare mide fundus dokusundaki COX enzim aktivitesi üzerinde zerdeçal (10µl/ml), E150d (14mg/ml) veya zerdeçal (10µl/ml)+E150d (14mg/ml) istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadı.

Özet olarak, deneysel veriler izole fare mide fundus şeritlerinde E150d ile indüklenen gevşeme yanıtlarında nitrejik sistemin ve potasyum kanallarının rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca E150d’nin ilgili dokuda süperoksid anyonlarını artırmak suretiyle SOD aktivitesini artırdığını, Ayurvedik drog zerdeçalın E150d ile antioksidan olarak etkileştiğini ve E150d’ye bağlı zararlı oksidatif stresin zerdeçal ile tedavi edilebileceğini telkin etmektedir.

Şimdiki çalışmamız, E150d’nin gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaları ve Ayurvedik drog olan zerdeçal ile olan etkileşmelerini farmakolojik bir yaklaşımla araştıran dünyadaki ilk çalışmadır. Bu çalışmanın ileride bu konuda yapılacak olan bilimsel çalışmalara ve karamel boyası E150d’nin potansiyel zararlarını önlemeye yönelik olan sağlık yaklaşımlarına katkı sağlayacağına inanılmaktadır.

Çalışmadaki E150d ve diğer kullanılan ajanların farklı konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde kullanılması ile daha detaylı veriler elde edilirdi. Ancak zaman ve bütçe yetersizliğinden dolayı belirtilen deneysel çalışmalar planlanamadı.



KAYNAKLAR

1. **Pugliese G, Tilton RG, Williamson JR.** Glucose-induced metabolic imbalances in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev.* **1991**;7(1):35-59.
2. **Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications *Nature.* **2001**;414(6865):813-820.
3. **Brownlee M, Cerami A, Vlassara H.** Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* **1988**;318(20):1315-1321.
4. **Ishii H, Koya D, King G.** Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Journal of molecular medicine,* **1998** 76:21-3.
5. **Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R.** High glucose-induced expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells *Diabetes.* **2003**;52(5):1256-64
6. **Nagpal M, Sood S.** Role of curcumin in systemic and oral health: an overview. *J Nat Sci Biol Med.* 2013 Jan;4(1):3-7
7. **Chainani-Wu N.** Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*) *J Altern Complement Med.* **2003**;9(1):161-168.
8. **Jurenka JS.** Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of curcuma longa: a review of preclinical and clinical research *Altern Med Rev.* **2009**;14(2):141-53.
9. **Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813-820.
10. **Fang XD, Yang F, Zhu L, Shen YL, Wang LL, Chen YY.** Curcumin ameliorates high glucose-induced acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2009**;36(12):1177-1182.
11. "Joint expert committee on food additive. caramel coloring. prepared at the 55th JECFA meeting," and published in FNP 52 Add. 8, **2000**.
12. American Beverage Association. Know your ingredients. Washington (DC): American Beverage Association , **2012**. Erişim: <http://www.ameribev.org/minisites/products>. Erişim tarihi: 20.04.2019
13. **Jacobson MF** Carcinogenicity and regulation of caramel colorings *Int J Occup Environ Health.* **2012** Jul-Sep;18(3):254-9
14. Sethness Roquette Caramel Colors & Caramelized Sugar Syrups Erişim: http://www.sethness.com/caramel_color_products/ Erişim Tarihi: 20.04.2019

15. **Nishie K, Keyl A, Waiss AC Jr.** Pharmacology of alkyl and hydroxyalkylpyrazines. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1970** Jul;17(1):244-249.
16. **Nishie K, Waiss AC Jr, Keyl AC.** Toxicity of methylimidazoles. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1969** Mar;14(2):301-307.
17. Toxicology and carcinogenesis studies of 2-methylimidazole (Cas No. 693-98-1) in B6C3F1 mice (feed studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* **2004**;(516):1-292.
18. **Chan PC, Hill GD, Kissling GE, Nyska A.** Toxicity and carcinogenicity studies of 4-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Arch Toxicol.* **2008**;82(1):45-53.
19. **Grosse Y, Baan R, Secretan-Lauby B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Islami F, Galichet L, Straif K.** Carcinogenicity of chemicals in industrial and consumer products, food contaminants and flavourings, and water chlorination byproducts. *Lancet Oncol.* **2011**;12(4):328-9.
20. Evaluation of certain food additives and contaminants : twenty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [meeting held in Geneva from 3 to 12 June 1985].
21. **Sayhan OZ, Elçioğlu HK.** *Eczacılar İçin Fizyoloji.* İstanbul Tıp Kitabevi **2015.** s207.
22. **Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM.** *Gray's Anatomy For Students Second Edition.* **2010.** s1076
23. **Karataş C.** Kasık ve çapraz gastrojejunostomi yapılan ratlarda mide boşalımının karşılaştırılması.Yüksek Lisans Tezi, İstanbul **2006.**
24. **Preston RR, Wilson TE.** *Lippincott Görsel Anlatımlı Çalışma Kitabı* **2012.**
25. **Erdoğan D.** Enterik Sinir Sistemi ve İnsan Sağlığındaki Rolü. *Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi* **2015**; Cilt 9, Sayı 3.
26. Türk gıda kodeksi gıda ve katkı maddeleri yönetmeliği, **2013.** Sayı : 28693
27. **Boğa UA, Binokay YD.** Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımıza Etkileri **2010** vol. 19: 141,.
28. **Merinas-Amo R, Martínez-Jurado M, Jurado-Güeto S, Alonso-Moraga Á, Merinas-Amo T** Biological effects of food coloring in in vivo and in vitro model systems. *Foods.* **2019** May 24;8(5).
29. **Shoberi NSB.** The role of pH, temperature and catalyst type in caramel manufacturing process.Bachelor Thesis, Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, Universiti Malaysia Pahang **2010.**
30. **Garza S, Ibarz A, Pagan J, Giner J.** Non-enzymatic browning in peach puree during heating. *Food Research International* Volume 32, Issue 5, **1999**;335-343

31. **Khoon Hong P, Betti M.** Non-enzymatic browning reaction of glucosamine at mild conditions: Relationship between colour formation, radical scavenging activity and a-dicarbonyl compounds production. *Food Chem.* **2016**;212:234-43
32. **Karaali A, Özçelik B.** Gıda katkısı olarak doğal ve sentetik boyalar. *GIDA* **1993**, pp. 389-396.
33. **Sengar G, Sharma HK.** Food caramels: a review. *J Food Sci Technol.* **2014** Sep;51(9):1686-1696.
34. **Stanic Z.** Curcumin, a compound from natural sources, a true scientific challenge- a review. *Plant Foods Hum Nutr.* **2017** Mar;72(1):1-12.
35. **Benzie IFF, Wachtel-Galor S.** Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. 2nd edition, **2011**.
36. **Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H.** The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2007**.
37. **Mehta HJ, Patel V, Sadikot RT.** Curcumin and lung cancer- a review. *Target Oncol.* **2014** Dec;9(4):295-310
38. **Serafini MM, Catanzaro M, Rosini M, Racchi M, Lanni C.** Curcumin in alzheimer's disease: can we think to new strategies and perspectives for this molecule. *Pharmacol Res.* **2017** Oct;124:146-155.
39. **Kotha RR, Luthria DL.** Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* **2019**;24(16), 2930.
40. **Zam W.** Gut Microbiota as a Prospective Therapeutic Target for Curcumin: A Review of Mutual Influence. *Journal of Nutrition and Methabolism* Vols. Volume **2018**, Article ID 1367984, 11.
41. **Çöteli E, Karataş F.** Zerdeçal (*Curcuma longa* L.) bitkisindeki antioksidan vitaminler ve glutatyon miktarları ile total antioksidan kapasitesinin belirlenmesi **2017** Vols. Cilt 33, Sayı 2.
42. **Sharma H, Clark C.** Çağdaş Ayurveda, Sistem Yayıncılık **2007**. s5-15.
43. **Patel S, Klagholz S, Peterson CT, Weiss L, Chopra D, Mills PJ.** Psychosocial Effects of a Holistic Ayurvedic Approach to Well-being in Health and Wellness Courses. *Glob Adv Health Med.* **2019**;8:2164956119843814
44. **Dondas N.,** Ayurvedik Tıpta Rasayanalar ve Bilimsel Çalışmalar *J Tradit Complem Med.* **2018**;1(2):70-75.
45. **Lad D. V.,** Ayurveda, Okyanus Yayıncılık, **2005**. s. 15-22
46. **Davis R. E.,** Ayurveda 'Bütün Olmanın Doğal Yolu'.Gazi Kitabevi, **1996**.
47. **Kayaalp S. O.,** Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji vol. 10. Baskı, **2002**. s.469.

48. **Beutner G, Sharma VK., Giovannucci DR, Yule DI,** Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria *J Biol Chem.* **2001**;276(24):21482-8.
49. **Bath P, Krishnan K, Appleton J.** Nitric oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke *Cochrane Database Syst Rev.* **2017**;4.
50. **Cui C, Merrit R, Fu L, Pan Z.** Targeting calcium signaling in cancer therapy, *Acta Pharm Sin B.* **2017**; 7(1): 3–17.
51. **Hall JE.** Guyton and hall textbook of medical physiology, **2016.** s797-806.
52. **Çöteli E, Karataş F.** Zerdeçal (Curcuma longa l.) bitkisindeki antioksidan vitaminler ve glutatyon miktarları ile total antioksidan kapasitesinin belirlenmesi. *Journal of Natural and Applied Sciences* **2017**;Cilt 33 Sayı 2.
53. **Fang X, Yang F, Zhu L, Shen Y, Wang L, Chen Y.** Curcumin ameliorates high glucose-induced acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2009**;36(12):1177-1182.
54. **Figarola J, Shanmugam N, Natarajan R, Rahbar S.** Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. *Diabetes.* **2007**;56(3):647-655.
55. **Cohen G, Riahi Y, Alpert E, Gruzman A, Sasson S.** The roles of hyperglycemia and oxidative stress in the rise and collapse of the natural protective mechanism against vascular endothelial cell dysfunction in diabetes. *Arch Physiol Biochem.* **2007**;113(4-5):259-267.
56. **Suryanarayana P, Satyanarayana A, Balakrishna N.** Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. *Med Sci Monit.* **2007**;12):BR286-292.
57. **Kowluru R, Kanwar M.** Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr Metab (Lond).* **2007**;4:8.
58. **Majithiya J, Balaraman R.** Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2005**;46(5):697-705.
59. **Hoshiyama M, Li B, Harada T, Morioka T, Oite T.** Effect of high glucose on nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase protein expression in human glomerular endothelial cells *Nephron Exp Nephrol.* **2003**;95(2):e62-68.
60. **Goligorsky M, Chen J, Brodsky S.** Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy : focus on nitric oxide. *Hypertension.* **2001**;37(2 Pt 2):744-748.
61. **Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo, G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F.** Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation.* **1997**;95(7):1783-1790.

62. **Du X, Stocklauser-Färber K, Rösen P.** Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med.* **1999**;27(7-8):752-763.
63. **Derubertis F, Craven P.** Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy *Diabetes.* **1994**;43(1):1-8
64. **Brodsky S, Morrishow A, Dharia N, Gross S, Goligorsky M.** Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2001**; 280(3):F480-486.
65. **Craven P, Studer R, DeRubertis F.** Impaired nitric oxide release by glomeruli from diabetic rats. *Metabolism.* **1995**;44(6):695-698.
66. **Abid M, Tsai J, Spokes K, Deshpande S, Irani K.** Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulates NADPH oxidase-dependent mechanism *FASEB J.* **2001**;15(13):2548-50.
67. **Yamashita T, Umeda F, Hashimoto T, Inoguch T, Yamauchi T, Mimura K, Watanabe J, Nawata H.** Effect of glucose on Na, K-ATPase activity in cultured bovine aortic endothelial cells. *Endocrinol Jpn.* **1992**;39(1):1-7.
68. **Lee T, MacGregor L, Fluharty S, King G.** Differential regulation of protein kinase C and (Na,K)-adenosine triphosphatase activities by elevated glucose levels in retinal capillary endothelial cells *J Clin Invest.* **1989**; 83(1): 90–94.
69. **Ashcroft F, The Walter B. Cannon Physiology in Perspective Lecture, 2007** ATP-sensitive K⁺ channels and disease: from molecule to malady., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2007**;293(4):E880-889.
70. **MacDonald P, De Marinis Y, Salehi A, Ma X, Johnson P, Cox R, Eliasson L, Rorsman P.** A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans *PLoS Biol.* **2007**; 5(6):143.
71. **Henquin J.** "Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation," *Diabetologia* **2009**; 52: 739-751.
72. **Angelova M, Genova L, Slokoska L, Pashova S.** Effect of glucose on the superoxide dismutase production in fungal strain *humicola lutea*, *Canadian Journal of Microbiology,* **1995**, 41(11): 978-983
73. **Shanmugam N, Gaw Gonzalo I, Natarajan R.** Molecular mechanisms of high glucose–induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes. *Diabetes,* **2004**; Mar;53(3):795-802.
74. **Valentovic M, Lubawy W.** Elevated glucose in vivo and in vitro adversely alters prostaglandin generation in rat aortas and platelets, *Prostaglandins Leukot Med.* **1985**; Sep;19(3):271-277.

75. **Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E.** Reactive Oxygen Species from Mitochondria Induce Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Human Mesangial Cells, *Diabetes*. **2003**; Vols. 52(10): 2570-2577.
76. **Consentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov M, Gatt C, Joch H, Volpe M, Luscher T.** High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species., *Circulation*. **2003**; 25;107(7):1017-1023.
77. **Smith W, Dewitt D.** Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. In *Advances in Immunology*., *J Biol Chem*. **1996**; 27;271(52):33157-33160.
78. **Wadleigh D, Herschman H.** Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene by diverse ligands in murine osteoblasts., *Biochem Biophys Res Commun*. **1999**; 2;264(3):865-870.

ÖZGEÇMİŞ

29.08.1989 yılında Adana’da doğmuştur. İlkokulu ve ortaokulu Devlet Su İşleri Baraj İlköğretim Okulu’nda, lise eğitimini 2007 yılında Adana Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2013 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun olduktan sonra aynı yıl Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi’nde eczacı ünvanıyla çalışmaya başlamış olup halen aynı yerde görev yapmaktadır. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

