

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



METABOLİK SENDROM OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
TRIBULUS TERRESTRIS'İN ADİPOZİT YAĞ ASİDİ
BAĞLAYICI PROTEİN (AFABP) VE OKSİDE LDL
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YASEMİN KAYAOĞLU

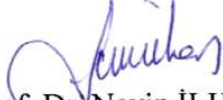
ELAZIĞ-2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına uygun bulunmuştur.



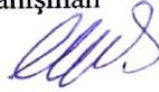
Prof. Dr. Nevin İLHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi
olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Danışman



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nevin İLHAN 

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ 

Prof. Dr. Berrin İmge Ergüder



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, babacan tavırları ile hoşgörü ve disiplini öğreten, tezimin tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen ve desteğini asla unutmayacağım değerli danışmam hocam Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ’a,

Yüksek lisans eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen hocalarım başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Nevin İLHAN’a, Prof. Dr. Necip İLHAN’a, Prof. Dr. Ferit GÜRSU’ya, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU’a, Prof. Dr. Süleyman AYDIN’a, Doç. Dr. Dilara KAMAN’a katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca deneysel çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Uzman Dr. Musa YILMAZ ve Yrd. Doç. Dr Naci Ömer ALAYUNT’a başta olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi ihtisas süresinde de yardımlarını ve sevgilerini esirgemeyen aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KAPAK SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	ix
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. METABOLİK SENDROM	5
3.1. Tanım ve Tarih	5
3.2. Tanı Kriterleri	5
3.3 Epidemiyoloji	7
3.4 Etyopatogenezi	7
4. METABOLİK SENDROM BİLEŞENLERİ	9
4.1 İnsülin Direnci	9
4.1.1. İnsülinin Etki Mekanizması	10
4.2 Obezite	14
4.3. Hipertansiyon (HT)	16
4.4. Dislipidemi	17
4.5. Diabetes Mellitus	18
4.6. Koroner arter hastalığı (KAH)	20

4.7. Endotel Disfonksiyonu	23
4.8. Non-alkolik yağlı karaciğer (NAYKH)	25
4.9. Polikistik over sendromu (PCOS)	27
4.10. Subklinik İnflamasyon	27
Demir Dikeni Bitkisi İle Hayvanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar	34
5. GEREÇ VE YÖNTEM	36
5.1. Deney Hayvanları ve Deneysel Çalışmasının Düzenlenmesi	36
5.2. Tribulus terrestris Bitkisinin Hazırlanış ve Uygulama Şekli	37
5.3. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması	37
5.4. Dokuların Homojenizasyonu	37
5.5. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	38
5.6. İstatistiksel Değerlendirme	40
6.BULGULAR	41
6.1 Bazal ve Haftalık Ağırlık Ölçümleri	41
6.2. Biyokimyasal Ölçümler	41
6.2.1. Rutin Biyokimya Testleri, Lipid profili, Açlık Kan Glukozu Düzeyleri	41
6.2.2 Western Blot Analizi	45
6.2.2.1 Qubit Fluorometre ile Protein Miktar Tayini	47
6.2.2.2 Ölçüm prosedürü	47
6.2.2.3 Jele Yüklenecek Protein Örneklerinin Hazırlanması	49
6.2.2.4 Dikey Jel Elektroforez Sistemi Kullanımı	49

6.2.2.5 İblot Dry Blotting System İle Blotlama İşlemi	51
6.2.2.6 Kromojenik Western Blot İmmüneteksiyon Kit Prosedürü	52
7. TARTIşMA	56
8. KAYNAKLAR	68
9. ÖZGEÇMİş	81



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Metabolik Sendrom Fizyopatolojisi	8
Şekil 2. Metabolik Sendrom Bileşenleri	9
Şekil 3. İnsülinin ana yolları	12
Şekil 4. Metabolik Sendromda Obezitenin Rolü	15
Şekil 5. Metabolik Sendromda Hipertansiyon Patogenezi	16
Şekil 6. Erişkinlerde tip 2 diyabet taraması ve tanılama	19
Şekil 7. Amerikan Kalp Derneği'ne göre plak evreleri	22
Şekil 8. Temel Ateroskleroz Süreci	23
Şekil 9. Endotel tabakasının görevini yerine getirebilmesi için Endotel Kaynaklı Konstriktör (EDCF) ve Endotel Kaynaklı Gevşetici (EDRF) maddelerin dengede olması gerekir	24
Şekil 10. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının klinik spektrumu	26
Şekil 11. Adiposit ve makrofajda ki AFABP'in rolü	29
Şekil 12. LDL oksidasyon mekanizmalar	31
Şekil 13. Tribulus terrestris bitkisi	33
Şekil 14. Tribulus terrestris meyvesi	33
Şekil 15. Kontrol ve mets grubunda ki yağ dokusunda AFABP'in western blotlama yöntemiyle gösterilmesi	55
Şekil 16. Tedavi grubunda ki Karaciğer ve yağ dokusunun AFABP'in western blotlama yöntemiyle gösterilmesi	55

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri	6
Tablo 2. ELİSA çalışması için gerekli cihaz ve malzeme listesi	39
Tablo 3. Gruplara Ait Sıçan Ağırlıkları Farkı	41
Tablo 4. Deney Sonu Serum Glukoz, Lipid Parametreleri, İnsülin ve HOMA-IR Düzeyleri	42
Tablo 5: Western Blot çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi	46
Tablo 6: Kontrol ve MetS gruplarına ait karaciğer ve yağ dokusu örneklerindeki protein miktarları	48
Tablo 7: Western blot çalışması için solüsyonların hazırlanışı	53

KISALTMALAR

AFABP	: Adiposit yağ asidi bağlayıcı protein
AP1	: Adaptor protein-1
APG	: Açlık plazma glukoz
COX 2	: Siklooksijenaz-2
CRP	: C-reaktif protein
DM	: Diyabetes mellitus
EDCF	: Endotel kaynaklı kasıcı faktör
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
ESAD	: Diyabet araştırmaları avrupa birliği
GLUT	: Glukoz taşıyıcı
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HOMA-IR	: homeostatik model değerlendirilmesi-insülin rezistansı
HT	: Hipertansiyon
IDDM	: İnsüline bağımlı diabetes mellitus
IDF	: Uluslararası diyabet cemiyeti
IFG	: Bozulmuş açlık glukozu
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGT	: Bozulmuş glukoz toleransı
IL-6	: İnterlökin-6
IRS	: İnsülin reseptör substratı
İKK	: Kappa kinaz inhibitörü
JNK	: c-Jun N-terminalkinases
KAH	: Koroner arter hastalığı

KB	: Kan basıncı
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPL	: Lipoprotein lipaz
MAP	: Mitojen aktiveli protein
MEK-1	: Mitojen aktiveli protein kinaz-1
MetS	: Metabolik sendrom
METSAR	: Türkiye metabolik sendrom araştırması
NASH	: Non alkolik steato hepatit
NAYK	: Non alkolik yağlı karaciğer
NCEP	: Ulusal kolesterol eğitim programı
NO	: Nitrik oksit
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
Ox-LDL	: Okside LDL
PCOS	: Polikistik over sendromu
PI-3K	: Fosfotidil inositol-3 kinaz yolu
PPAR	: Peroksizom proliferatör-aktif reseptörler
SYA	: Serbest yağ asitleri
TEKHARF	: Türk erişkinlerinde kalp hastalıkları ve risk faktörleri
TG	: Trigliseritleri
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
TT	: Tribulus terrestris
TZD	: Tiazolidinedionlar
VKİ	: Vücut kitle indeksi
VLDL-K	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
WHO	: Dünya sağlık örgütü

1. ÖZET

İnsülin direnciyle başlayan metabolik sendrom (MetS); abdominal obezite, diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon (HT) ve koroner arter hastalığı (KAH) gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği bir sendrom olarak tanımlanmıştır. Metabolik sendrom; insülin direnci sendromu, polimetabolik sendrom, sendrom X, ölümcül dördü ve uygarlık sendromu gibi farklı terimlerle de adlandırılmaktadır.

Abdominal obezitedeki sitokin üretimi MetS'un patogeneğinde ki önemli rol oynayacağı ileri sürülmüştür.

MetS'un prevalansındaki artışlar sebebiyle bilim insanları bu konuda daha fazla araştırma yapmaya gereksinim duymuşlar. Bu çalışmalarda fruktoz metabolizmasının obezite, insülin direnci, inflamasyon, HT ve karaciğer yağlanması üzerine etkisinin olduğunu ve bu nedenle MetS geliştirme riskini de arttırdığını düşünüldüğü için önemli bileşenlerin geliştiği deneysel modellere gereksinim duyulmuştur.

Biz bu çalışmada; fruktoz diyeti ile metabolik sendrom oluşturulmuş sıçanlarda, Tribulus terrestris ekstraktı'nın metabolik sendromun ve prelevansının artışı açan mekanizmalara olan etkilerini araştırıp, AFABP ve Ox-LDL düzeylerinin elde edilecek veriler ile literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

Çalışmada, 240-260 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi 21 rat kullanıldı. Ratlar her bir grupta 7 rat olmak üzere üç gruba ayrıldı. Grup 1: Kontrol grubu 10 hafta boyunca standart beslenme uygulandı. Grup 2: Fruktoz ile MetS oluşturulan grup 10 hafta boyunca standart beslenme ve %10 oranında

fruktoz uygulandı. Grup 3: MetS oluştuktan sonra 8 hafta boyunca Tribulus terrestris bitki ekstratı verilen grup. Çalışma tamamlandıktan sonra ratlar dekapite edilerek alınan kan örneklerinden numunlerde; serum glukoz, Total kolesterol, HDL, LDL, IL-6, TNF- α , Ox-LDL düzeyleri ve ratlardan alınan karaciğer ve yağ dokusu örneklerinden AFABP ekspresyonu ve Tribulus terrestris bitkisinin bu parametreler üzerine etkileri incelendi.

MetS grubunda serum insülin, glukoz, HOMA-IR, trigliserid, total kolesterol, LDL-K, TNF- α , IL-6 ve Ox-LDL düzeyleri ölçüldüğünde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek iken; HDL-K düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,01$). Ox-LDL, LDL, insülin ve HOMA-IR düzeyleri MetS oluştuktan sonra Tribulus terrestris bitki ekstraktı verdiğimiz gruplarda anlamlı ($p<0,05$) düşük iken; HDL-K düzeyleri anlamlı ($p<0,05$) şekilde artmıştır. MetS oluştuktan sonra Tribulus terrestris bitki ekstraktı verdiğimiz gruplarda serum glukoz, total kolesterol, trigliserid, TNF- α ve IL-6 değerlerinde düşüş gözlemlendi, fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Çalışma sonucu elde edilen verilere göre gruplar arasında Kruskal Wallis, ikili karşılaştırmalar da Mann Whitney-U testi ve en düşük istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p<0,05$ değeri kullanıldı.

Sonuç olarak, Tribulus terrestris bitki ekstratının karaciğer ve yağ dokusu, insülin metabolizması ve lipid profili üzerine olumlu etki yapabildiği ve MetS'lu hastalarda kullanımının yararlı olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Metabolik Sendrom, Tribulus terrestris, Ox-LDL, AFABP

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF TRIBULUS TERRESTRIS ON THE LEVEL OF ADIPOCYTE FATTY ACID BINDING PROTEIN AND OXIDIZED LDL IN THE RATS WITH INDUCED METABOLIC SYNDROME

The metabolic syndrome (MetS), occurs with co-development of insulin resistance, abdominal obesity, diabetes mellitus, dyslipidemia, hypertension and coronary artery disease is added to each other is defined as a syndrome of systemic disorders. MetS is also called insulin resistance syndrome, polymetabolic syndrome, syndrome X, deadly quartet, and civilization syndrome.

It has been proposed that cytokine production in abdominal adipose tissue can play a prominent role in the pathogenicity of MetS.

Science people, owing to the increase in prevalence of MetS, they need to do more research on this topic. In this study of fructose metabolism in obesity, insulin resistance, inflammation, hypertension and fatty liver effects, and therefore increases the risk of developing considering that of the important components for the Mets developed experimental models were needed.

In this study, we had the purpose to contribute to the literature with the data to be obtained from investigating the mechanism of the reason of increase of the development and the prevalence of the tribulus terrestris extract metabolic syndrome, AFABP and Ox-LDL, having a metabolic syndrome formed in rats with a fructose diet.

In the study, 21 Sprague-Dawley rats about weight of 240-260 g have been used. The rats were separated to 3 groups, each of which has 7 rats. Group1;

control group (10 weeks), Group2; MetS with fructose (10 weeks), Group3; given Tribulus terrestris after MetS progress (10+8 week) in created. Rats were decapitated after the study. Blood samples were taken, the glucose, total cholesterol, HDL, LDL, IL-6, TNF- α and Ox-LDL levels, Liver and adipose tissue samples taken from the rats were measured in the serum, and the effects of Tribulus terrestris on these parameters were examined.

Serum insülin, glucose, HOMA-IR, triglyceride, total cholesterol, LDL-C, TNF- α , IL-6 and Ox-LDL levels measuring were compared to the control group found statistically significantly higher and the HDL-C levels was compared to compared to the control group found statistically significantly lower in the metabolic syndrome groups ($p<0,01$). After the formation of MetS, that we gave the Tribulus terrestris plant extract groups Ox-LDL, LDL, insülin ve HOMA-IR levels significantly different ($p<0,05$) were lower whereas the HDL-C levels significantly different ($p<0,05$) were higher. After the formation of MetS, that we gave the Tribulus terrestris plant extract groups serum glucose, total cholesterol, triglyceride, TNF- α ve IL-6 levels were lower, but the decrease did not have a statistical significiance ($p>0,05$).

According to data obtained as a result of the study, Mann Whitney-U test and Kruskal Wallis the value of $p<0,05$ was used as a level of statistical significiance in a pair wise comparision between the groups.

Consequently, Tribulus terrestris plant extract have a positive effect on the liver and adiposet issue, insülin metabolisman lipid profile which can be useful to in the patients with MetS and it looks like a promising option has been concluded.

Keywords: Metabolic Syndrom, Tribulus terrestris, Ox-LDL, AFABP

3. METABOLİK SENDROM

3.1. Tanım ve Tarih

Metabolik sendrom (MetS); hipertansiyon (HT), hiperglisemi ve gut hastalığının birlikte varoluşu ile ilk kez 1923 yılında tanımlanmıştır. Obezite, diyabet, ateroskleroz ve gut hastalığı ile ilişkili olabileceği 1940'ın sonlarında bildirilmiştir (1). Diyabet Araştırmaları Avrupa Birliği (ESAD)'nin 1965'de yıllık toplantısında, MetS HT, hiperglisemi ve obezite den oluşan bir sendrom olarak bildirildi (2). 1970'li yıllarda, ilk kez Alman araştırmacılar MetS terimini kullanıp ateroskleroz ile ilişkisi araştırıldı. Reaven ilk kez 1988 yılında sendrom X olarak adlandırdığı çeşitli risk faktörlerinin birarada bulunduğunu gözlemlemiş ve buna bağlı olarak kardiyovasküler hastalıkların arttığını belirtmiştir (3).

İnsülin direnciyle başlayan MetS; diabetes mellitus, abdominal obezite, hipertansiyon, koroner arter hastalığı (KAH) ve dislipidemi gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği bir sendrom olarak tanımlanmıştır. MetS aynı zaman da; insülin direnci sendromu, polimetabolik sendrom, sendrom X ve ölümcül dördü gibi farklı terimlerle de adlandırılmaktadır(4).

3.2. Tanı Kriterleri

Metabolik Sendrom sıklığı kriterlere ve toplumlara göre değişkenlik göstermektedir (3). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Diyabet Cemiyeti (IDF) ve Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP) MetS tanı kriterleri önermişlerdir (Tablo 1) (5).

Tablo 1. Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri

Risk Faktörü	Dünya Sağlık Örgütü (WHO)	Uluslararası Diyabet Cemiyeti (IDF)	Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP)
VKİ	VKİ>30 kg/m ²		
Bel/kalça oranı			
Kadın\Erkek	>0,85 >0,90		
Bel çevresi			
Kadın\Erkek		≥80 cm , ≥94 cm	>88 cm , >102 cm
Trigliserid (TG)	>150 mg/Dl	>150 mg/dL	>150 mg/dL
Kadınlarda HDL	<40 mg/dL	<50 mg/dL	<50 mg/dL
Erkeklerde HDL	<35 mg/dL	<40 mg/dL	<40 mg/Dl
Kan basıncı (KB)	KB ≥140/90 mm Hg	KB≥130/85 mm Hg	KB≥135/85 mm Hg
Glukoz	Bozulmuş glukoz toleransı veya Tip 2 DM	Açlık glukozu ≥100 mg/dl veya tip 2 DM	Açlık glukozu ≥110 mg/Dl
Diğer Tanı Kriterleri	Mikroalbuminüri Bozulmuş glukoz toleransı veya doğrulanmış tip 2 DM ve yukarıdaki kriterlerden herhangi ikisi tanesi	Abdominal obezite ve yukarıdaki kriterlerden herhangi ikisi	Yukarıdaki herhangi üç kriter

DM, diabetes mellitus; VKİ, vücut kitle indeksi; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein

2004 yılında WHO, metabolik sendromu; Bozulmuş glukoz toleransı veya doğrulanmış tip 2 DM ile birlikte; VKİ, bel çevresi ve kalça oranı, TG, HDL, KB ve mikroalbuminüri gibi kriterlerinden herhangi ikisinin bir arada olması;

NCEP'na göre; Bel çevresi, trigliserid, HDL, kan basıncı ve glukoz gibi kriterlerden herhangi üçünün bir arada olması;

IDF'ne göre ise; abdominal obezite ile birlikte, bel çevresi, TG, HDL, KB ve glukoz gibi kriterlerden herhangi ikisinin bir arada olması olarak tanımlamıştır (5).

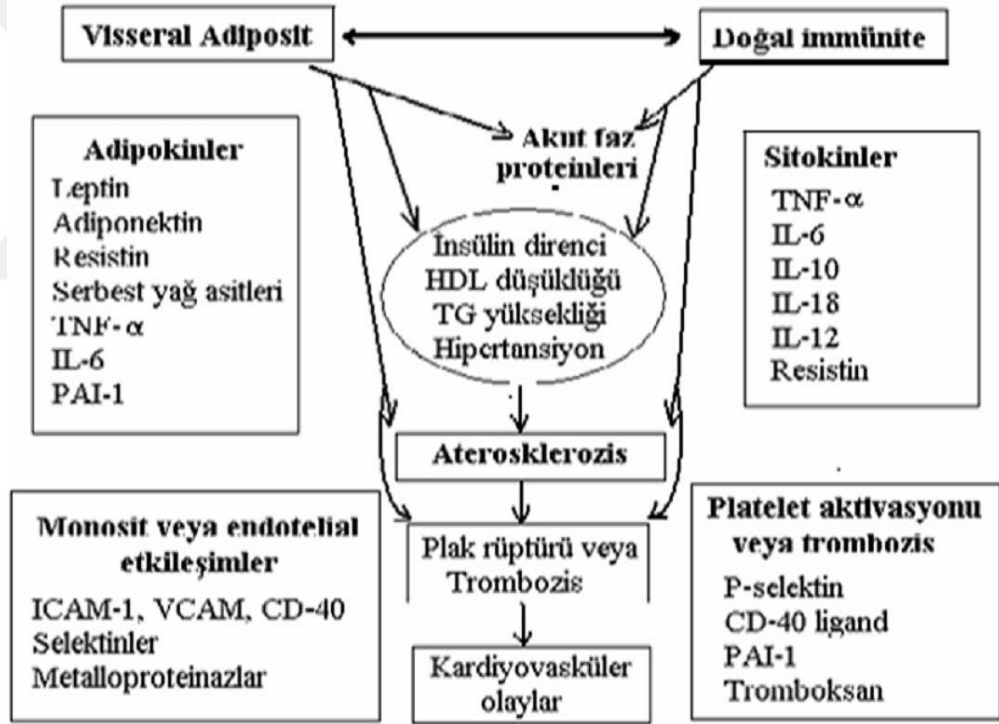
3.3 Epidemiyoloji

Son yıllarda MetS sıklığının giderek arttığı gözlenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde NCEP sonuçlarına göre yapılan bir araştırmada kadınlarda MetS sıklığı %35,4 iken bu oran erkeklerde %33,7 olarak belirlenmiştir, ancak IDF sonuçlarına göre kadınlarda ki MetS sıklığı %38,1 iken erkekler de %39,9 olarak belirlenmiştir (6). Türkiye genelinde "Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri (TEKHARF)" çalışmasına göre; 2000 yılından itibaren 30 yaş ve üzerindeki yaş grubunda MetS gözlenmiştir (7). Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması (METSAR) ülkemizde yapılan çalışmalardan en etkin olanıdır. 2004 yılında yapılan METSAR sonuçlarına göre yapılan bir araştırmada kadınlarda MetS sıklığı % 41 iken erkekler de bu oran % 28,8 olarak belirlenmiştir (5). 2010 yılında yapılan Metabolik Sendrom Derneği Türkiye Sağlık Çalışması'nın verilerine göre bel çevresi, kadınlarda > 80 cm, erkeklerde ise > 94 cm alınmıştır; kadınlardaki MetS sıklığı %43,5 iken erkeklerde %41,4 olarak belirlenmiştir (8).

3.4 Etyopatogenezi

MetS'un ülkemizde ve dünyada erişkin toplumun üçte birinde bulunması ve yaş ile orantılı olarak artması metabolik sendromu giderek artan toplumsal sağlık sorunu haline getirmektedir (4).

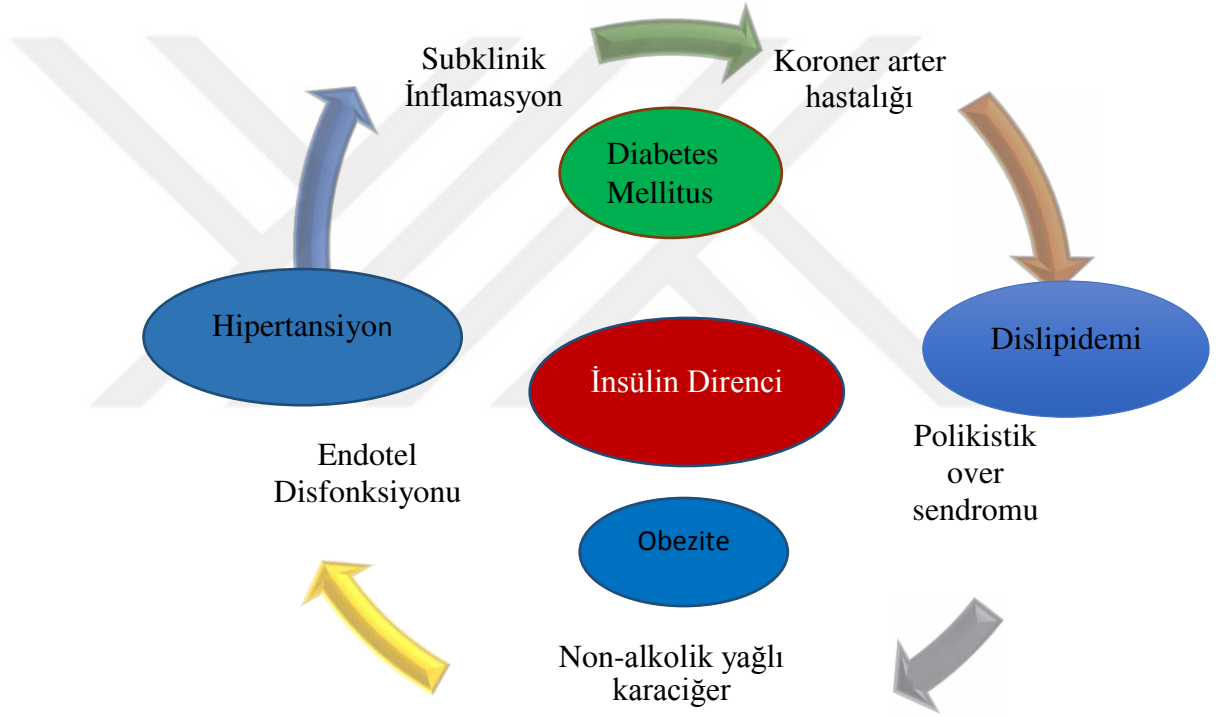
MetS etyolojisinde; genetik faktörler, edinilmiş nedenler ve insülin direnci önemli rol oynamaktadır. Genetik faktörler MetS patogenezin ve ilerlemesine neden olabilir. Edinilmiş nedenler; dengesiz beslenme, stres, yaş, obezite, fiziksel inaktivitedir (9). Hareketsiz yaşam tarzının benimsenmesi ve yüksek kalorili beslenme sonucu obezite gelişimi insülin direncine neden olur. İnsülin direnci, MetS'un temelini oluşturur (10). İnsülin direnci; dislipidemi, hiperglisemi, hipertansiyon ve obezite gibi MetS'u oluşturan patolojilerde önemli rol oynar (11,12).



Şekil 1. Metabolik Sendrom Fizyopatolojisi (13)

4. METABOLİK SENDROM BİLEŞENLERİ

MetS bileşenleri; insülin direnci, obezite, hipertansiyon, dislipidemi, diabetes mellitus, Tip2 DM, koroner arter hastalığı, non-alkolik yağlı karaciğer, endotel disfonksiyonu, polikistik over sendromu ve subklinik inflamasyon'dur (4,5).



Şekil 2. Metabolik Sendrom Bileşenleri (13)

4.1 İnsülin Direnci

Metabolik açıdan insülin direnci, insülinin hücre düzeyindeki metabolik olaylara etkisinin azalması olarak ifade edilmektedir.

Vücutta insülin direncinin başlamasıyla kaslarda glukoz alımında bozulma, karaciğerde artan glikojen yıkımı ve glukoneogenez ile karaciğerden glukoz

çıkışında artma olmakta ve bu artan kan glukoz seviyelerini dengelemek için daha fazla insülin üretilir ve sonuçta hiperinsülinemi meydana gelmektedir. Pankreas beta hücreleri, insülin konsantrasyonunu kanda sürekli yüksek düzeyde tutmak zorunda oldukları için zamanla sentez ve sekresyon kapasitesini kaybetmekte ve artan kan şekeri pankreas beta hücrelerinde duyarsızlaştırmaya neden olmaktadır (14).

Obezite ve fiziksel inaktivite gibi faktörler; insülin direnci gelişimine neden olmaktadır. Subkutan yağ dokusu ve visseral gibi hücrelerde insülin reseptör etkileşmesinin bozulması sonucu insülin direnci oluşur. Fruktoz diyeti ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu rat modellerin de obezite oluşturulmuş ve bunun sonucu olarak insülin direncinin geliştiği gözlenmiş olup ve bu rat modellerin de glukoz intoleransı, plazma serbest yağ asidi ve yağ hücre sayısındaki artışı, hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi ve HT gözlenmiştir (15,16).

Tip 2 diyabet patogeneğinde; insülin direnci ve yağ dokusundaki artışın bir arada olduğu gözlenmiş olup insülin direncinde; plazma lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesi azalıp plazma TG ve karaciğerde LPL aktivitesinin artmasıyla HDL-K'nin yıkımı hızlanarak dolaşımda ki yağ asitlerini azaltıp bir çok dokuda amino asitlerin hücre içine girişini ve protein sentezini uyarmaktadır. Sonuç olarak, insülin düzeyi azalmakta, kan glukoz düzeyleri ise artmaktadır (17).

4.1.1. İnsülinin Etki Mekanizması

Sağlıklı bireylerin kas, yağ ve karaciğer doku hücrelerindeki glukoz transportu, glukoz taşıyıcılarının rol aldığı kolaylaştırılmış difüzyonla olmaktadır. İnsülinin hücre zarlarında bulunan insülinin reseptörlere bağlanması ile oluşan sinyallerin iletiminde tirozin kinaz etkin rol oynar ve reseptördeki spesifik tirozin

rezidülerinin otofosforilasyonu sonucunda, fosforile trozin rezidülerine sahip aktive olmuş insülin reseptörü hücre içi sinyal iletimini başlatır (18). Sinyal iletiminde rol alan anahtar proteinler; IRS 1-2, Shc (Src Benzeri Protein,) ve Grb2 (büyüme faktörü reseptörü bağlı protein 2) dir. IRS (insülin reseptör substrat) protein grubunda 4 ana protein vardır. İntrasellüler sinyal ileti sisteminde en etkin rol oynayan proteinler IRS 1 ve IRS 2 olup, IRS1 adipoz dokuda IRS 2 karaciğerdeki glukoz taşınımından sorumlu iki farklı fonksiyonu olan proteinlerdir.

İnsülin sinyali için iki temel yol vardır (19);

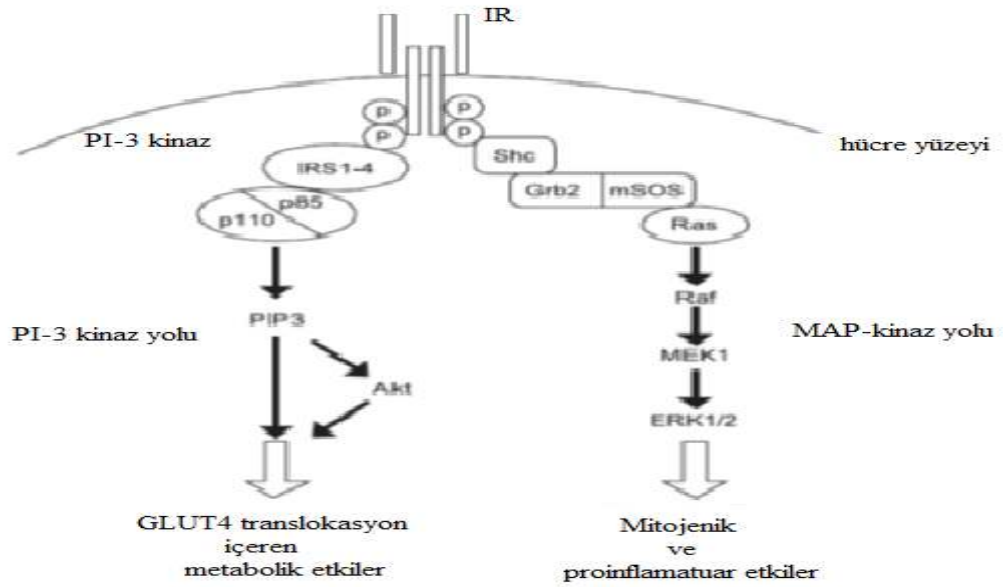
- 1) Fosfotidil inozitol-3 kinaz yolu (PI-3K);
- 2) Mitojen aktiveli protein (MAP) kinaz yolu ;

1) Fosfotidil inozitol 3 kinaz yolu (PI-3K); PI-3K yolu, insülin reseptör substratlarının (IRS-1,2,3,4) tirozin fosforilasyonu ile başlamakta ve PI-3K'nın düzenleyici ünitesi olan p85 ile ilişki halindedir. PI-3K, fosfotidil inositol 3,4,5 trifosfat (PIP3) artışını sağlar. Bu da akt'ın aktivasyonu ve glukoz taşıyıcı-4 (GLUT4)'ün hücre içine taşıyan metabolik yolların doğrudan azalmasına neden olur.

2) Mitojen aktiveli protein (MAP) kinaz yolu; MAP kinaz yolu ise Shc'nin fosforilasyonu ile başlamakta, Shc (Src Benzeri Protein), Grb 2'ye bağlı ve mSOS aracılığı ile Ras uyarılmasını sağlamaktadır. Ras'ın bağlanması ile öncelikle Raf, daha sonra MEK-1 (Mitojen Aktiveli Protein Kinaz-1) aktive olur. Bu aktivasyon sonucunda glikojen sentezi, hücre büyümesi ve GLUT4'ün myosit, adiposit ve plazma membranlarına geçişi sağlanmaktadır. MEK-1 hücre dışı

sinyal düzenleyici kinazı (ERK-1 ve 2) uyarır, bunlarda insülinin mitojenik ve proinflamatuar etkilerinden sorumludur.

Metabolik sendromda PI-3K yolunun uyarılması, insülin reseptörünün veya IRS proteinin; serin veya treonin amino asitlerinin fosforilasyonu veya defosforilasyonu ile engellenmişken, MAP kinaz yolu ise aşırı duyarlıdır (20). Böylece uygun serin veya treonin kinaz antagonistlerinin kullanımı MAP-K ve PI-3K sinyal yolu arasındaki dengeyi düzenlerler.



Şekil 3. İnsülinin ana yolları(21)

Son zamanlarda, insülin direncinde yağ dokusunun etkileri önem kazanmaya başlamıştır. Yağ dokusundan salınan serbest yağ asitlerinin; tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interleukin-6 (IL-6) gibi sitokinlerin insülin direncini etkilediği ortaya atılmıştır. Obez kişilerde artan TNF- α hücre içi kalsiyum seviyesini artırarak GLUT-4 ekspresyonu inhibe eder, böylece glukozun tutulması

bozulur. Ayrıca TNF- α insülin reseptör tirozin kinaz ve fosforilasyon ile IRS-1'in aktivasyonunu artırıp bunu bir reseptör inhibitörü haline getirmektedir (22).

MetS'un temel özelliği yağ hücrelerinden serbest yağ asitlerinin üretimi ve salınımının normal insülin düzeyleri ile baskılanamamış olmasıdır (21). MetS' lu bireyler Tip 2 diyabet açısından yüksek risk taşımakta ve bu risk faktörlerinin temelini insülin direnci ve abdominal obezite oluşturmaktadır. İnsülin yetersizliğinin geliştiği obez kişiler Tip 2 diyabet oluşumuna daha duyarlı olmalarından dolayı obezitenin insülin direnci oluşumunun etkin sebebi olduğu iddia edilmiştir (23,24). İnsülinin eksikliğine bağlı olarak hedef dokularda karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında da bozukluklar meydana gelir. Tip 2 diyabetiklerde insülin direncinin olmadığı durumlarda, DM veya bozulmuş glukoz toleransının varlığı MetS tanı kriterlerinin ilk aşamasını oluşturduğu için artık insülin direncinin varlığı aranmaz.

İnsülin duyarlılığını ölçmek için insülin duyarlılık indeksleri, oral glukoz tolerans testi, insülin glukoz C-peptid oranları, hiperinsulinemik öglisemik klemp testi, insülin direncinin değerlendirildiği homeostatik model (HOMA -IR) gibi çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bunlar arasında altın standart insülinin intravenöz olarak sabit bir hızda infüze edildiği ve kan glukozun düzeylerinin sık sık ölçüldüğü öglisemik klemp tekniğidir. Ancak bu yöntem çok zaman alıcı olup deneyimli kişilerin varlığını gerektirdiğinden sık kullanılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı Matthews ve arkadaşları tarafından belirlenen ve kolay olan HOMA-IR formülü geliştirilmiştir (23,25,26).

$$\text{HOMA-IR} = \text{Açlık glukoz düzeyi (mmol/l)} \times \text{Açlık insülin düzeyi (}\mu\text{U/ml)} / 22,5$$

4.2 Obezite

MetS'un gelişiminde obezite merkezi bir rol oynamak ve vücutta aşırı yağın birikmesiyle obezite oluşmaktadır. Obezite, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşmesi sonucu meydana gelen kronik bir hastalıktır. Kültürel, fiziksel, sosyal ve genetik faktörlerin etkileşimi sonucu gelişmiştir (27,28).

Ortalama vücut ağırlığına sahip kadınlarda vücut yağı %25-30 iken bu oran erkekler de ise %15-20'dir. Bu oranın üstüne çıkılması obezite olduğuna işaret etmektedir. 2010 yılında Türkiye' de yapılan Türkiye beslenme ve sağlık araştırması raporuna göre; erkeklerde ki obezite sıklığı %20,5 iken; kadınlarda bu oran %41,0'dir. Toplamda ise %30,3 olarak saptanmıştır. WHO obeziteyi belirlemek için VKİ'ni kullanmaktadır.

VKİ= Vücut ağırlığı(kg) / Boy (m²)

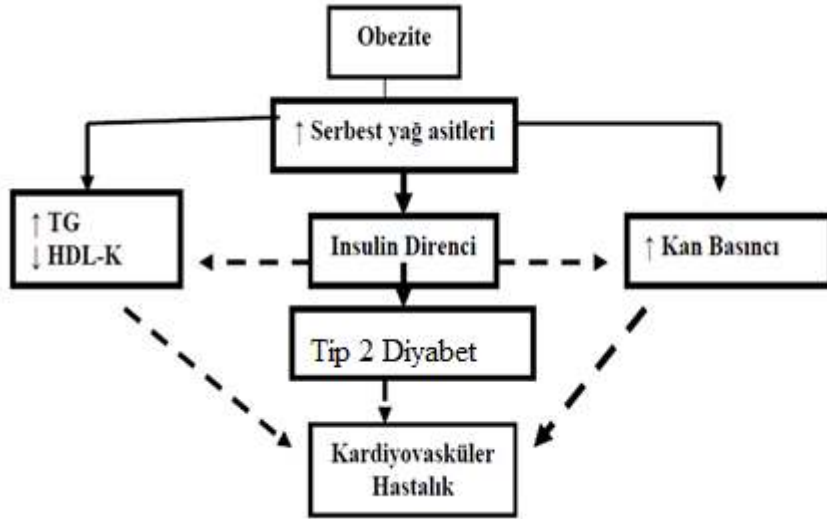
VKİ < 18.5 kg/m² ise zayıf

VKİ = 18.5-25 kg/m² ise normal

VKİ > 25-30 kg/m² ise preobez olarak kabul edilmekte ve VKİ >30 ise obeziteyi işaret etmektedir (26,28,30).

Obezite; HT, Tip 2 diabetes mellitus, dislipidemi, KAH, osteoartrit, solunum problemleri, prostat ve kolon kanseri gibi bir çok sağlık sorununun oluşmasına yol açmıştır (29,30).

Obezite; HDL kolesterol düzeyleri ile negatif ilişki gösterirken; kan basıncı, açlık kan glukozu ve insülin değerleri ile pozitif ilişki göstermektedir (27). Obezitenin metabolik sendromdaki rolü Şekil 4'de gösterilmiştir (31).



Şekil 4. Metabolik Sendromda Obezitenin Rolü (31)

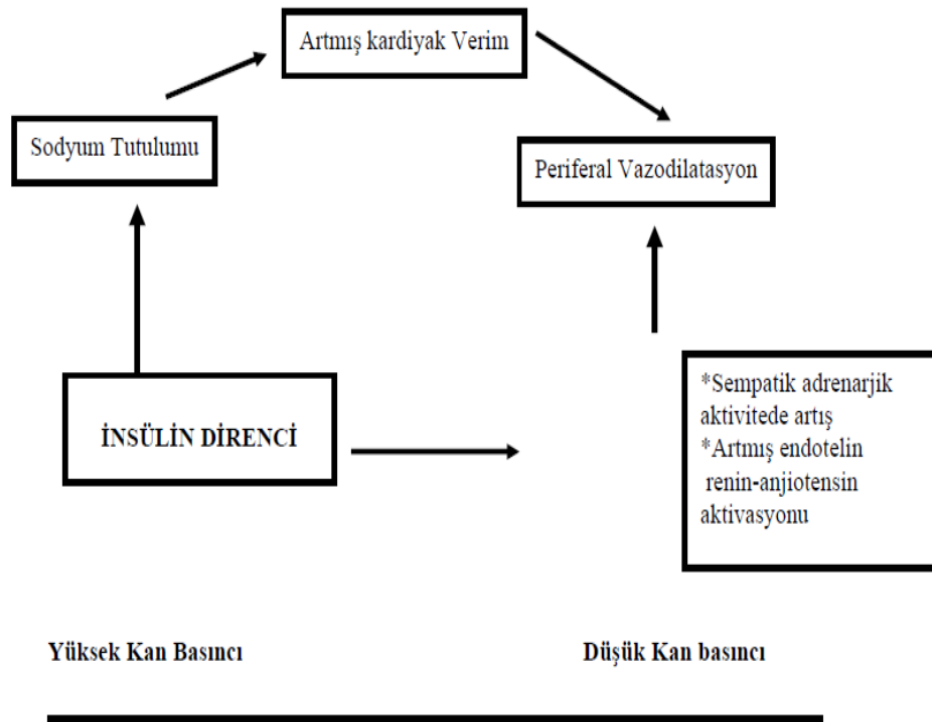
Obezite tek başına insülin direncine neden olabiliyorken insülin direnci de obeziteyi hızlandırır. Obez bireylerin iskelet kaslarında bazı yetersizlikler ve sorunlar oluşmaktadır. Obez hastalarda, adipoz dokudan salgılanan esterleşmemiş yağ asitleri (NEFA), inflamatuvar sitokinler, adiponektin ve leptin gibi bazı faktörler MetS ve insülin direncinin oluşmasını kolaylaştırır (14, 31-35). Genetik olarak bazı bireylerde insülin direncinin olması ve buna bağlı olarak açlık durumunda insülin düzeylerinin yüksek olması adipoz dokudaki lipolizin sürekli olarak baskılanmasına sebep olmaktadır. Adipoz doku; TNF- α ve IL-6 gibi birçok inflamatuvar sitokini de üretmekte ve bu sitokinler karaciğer, kas ve arter duvarları gibi diğer dokularda inflamatuvar reaksiyonları başlatabilmektedirler. Sitokinlerin üretiminin sebeplerinden biri obezitedir (33).

Obez bireylerde; adipoz dokudan salgılanan ve iştahın baskılanmasına neden olan leptin hormonu düzeyinin yüksek olması sonucu insülin direnci artmaktadır. Leptin hormonunun merkezi sinir sistemine etki etmesi sonucu, karaciğerdeki yağ asidi oksidasyonu gelişir ve dolayısıyla leptin hormonuna

dirençli olan dokularda hem insülin direnci hem de metabolik sendromun oluşması kolaylaşmaktadır (33,36).

4.3. Hipertansiyon (HT)

Hipertansiyonun etkin faktörü insülin direncidir. Normal kilolu bir insana insülin verildiği zaman damarda vazodilatasyon etki olmaktadır fakat insülin direncinde; insülinin vazodilatatör etkisi yok olmaktadır (37,38). Hem insülinin hem de insülin direncinin böbrekten sodyum tutulumu üzerine etkisi vardır (39). Sodyum tutulumu kardiyak verimini artırır, periferel vazodilatasyon ise kan basıncı normal seviyeye getirip denge sağlanır (Şekil 5). Fakat insülin direncinin olduğu durumlarda periferel vazodilatasyon bozulur ve dolayısıyla sodyum tutulumu gerçekleşir ve kan basıncı artar (40).



Şekil 5. Metabolik Sendromda Hipertansiyon Patogenezi (40)

MetS'un tanımlanmasında kullanılan yüksek kan basıncı, ile olan ilişkisi karmaşıktır. Çok değişkenli teknikler, HT'un MetS'da ki diğer değişkenlerin bağımsız bir şekilde ayrılması eğiliminde olduğunu göstermektedir. Yine de, çoğu uzman hipertansiyonun tanı kriterlerinde seçeneklerden biri olarak kalması gerektiği ile aynı fikirdedirler. Hipertansiyon ve vücut ağırlığı arasında ki korelasyon, insülin direnci ve hipertansiyon arasındaki negatif korelasyon, diyabetik hastalardaki hipertansiyonun sıklığındaki artış, aterosklerotik riskte gibi diğer faktörler ve hipertansiyonun interaktif rolü bu tartışmanın kilit noktalarını içerir. Obezitenin aterosklerozdaki interaktif rolü yeterli olmayabilir, çünkü LDL kolesterol sinerjistik olarak aterosklerotik riskini artırır fakat büyük ölçüde diğer korelasyondan yoksun ve MetS'un parçası olarak kabul edilmez (41-43).

4.4. Dislipidemi

Plazmadaki lipid fraksiyonlarının (kolesterol-trigliserid) normal aralıkların dışında seyretmesine denir. Kardiyovasküler riskinin en önemli unsurlarından biri dislipidemidir. Günümüzde epidemiyolojik veriler, kardiyovasküler riskini tahmin etmeye yarayan ölçeklerin oluşmasına sebep olmuştur (44).

Ateroskleroza bağlı kardiyovasküler hastalıklar dünyada ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer alıp ve tüm global ölümlerin %30'u kardiyovasküler hastalıklar ile bağlantılıdır. Ateroskleroz için bilinen en önemli risk faktörlerinden biri dislipidemidir. Kan yağlarının oranlarının sağlığı olumsuz etkileyecek yöndeki değişiklikleri; plazma lipoprotein ve TG düzeyinin yükselmesi sonucu dislipidemi oluşmaktadır. TG yüksekliği, HDL kolesterol düşüklüğü ve LDL yüksekliği ile korelasyon gösterir (45).

Viseral obesitede viseral yağ dokusundan karaciğere fazla miktarda serbest yağ asitleri (SYA) akımı olduğu için SYA'lerinden karaciğerde endojen trigliserid sentezi meydana gelir ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (VLDL-K) olarak dolaşıma katılır. İnsülin direnci olduğunda VLDL-K sentezi ve dolaşıma geçişi artar. Dolaşımda fazla miktarda VLDL-K'nın bulunması düşük LPL aktivitesine rağmen normal düzeyde LDL-K vardır (46).

Dislipidemi tanı ve tedavisinde; KAH, lipoprotein düzeylerinin ve LDL-K risk faktörleri belirlenip bu kriterlere göre; LDL kolesterol düzeyi saptanan değerin üstünde ise tedavi amaçlı yaşam tarzı değişiklikleri ve gerekirse ilaç tedavisinin başlatılması gereklidir (45).

4.5. Diabetes Mellitus

Çevresel ve kalıtsal etkenlerin birleşimi ve kan glukoz seviyesinin aşırı derecede yükselmesi sonucu oluşan metabolik bir bozukluktur (47).

Tip 1-2 diyabet olmak üzere 2 türü vardır.

Tip 1 diyabet; insüline bağımlı diabetes mellitus (IDDM) olarak adlandırılan ve ömür boyu süren bir hastalıktır. Bu hastalıkta, pankreasın beta hücrelerinin ürettiği insülin hormonunun çok az üretildiği veya hiç üretilmediği için kandaki şekerin hücre içine girmemesi sonucu kanda glukoz seviyesi yükselmektedir. Artan kan şekerine yanıt olarak pankreasta insülin üreten hücreler, insülin hormonu salgılar ve vücudun kendi bağışıklık sistemi tarafından zarar görmesiyle Tip 1 diyabet oluşur. Tip 2 diyabet ise; insülinin etkisine karşı direnç kazanması sonucu insülin sentezi ve salgılanmasında azalma ya da tamamen yok olması sonucu oluşur.

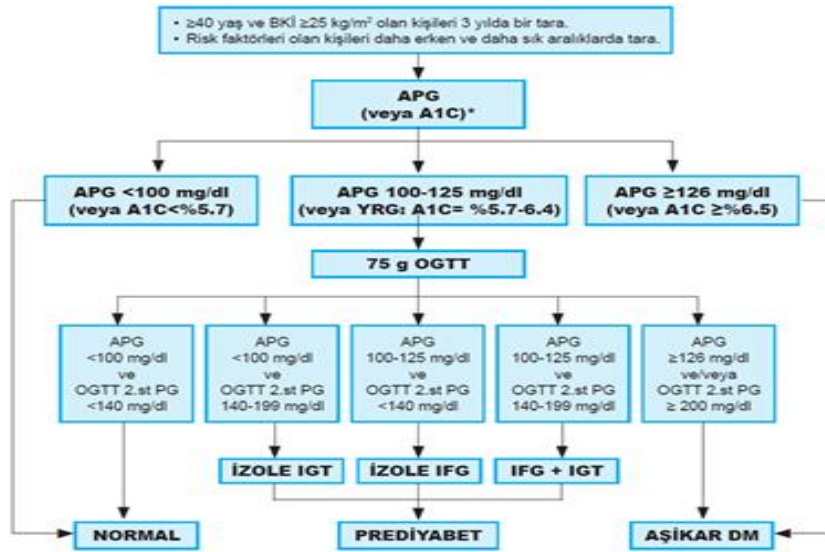
İnsülin hormonu normalde; glukozun hücrelerin içine girmesini ve yakılarak diğer dokulara enerji ulaştırılmasını sağlar böylece bir taraftan enerji sağlanırken öte yandan kandaki şeker seviyesi düşer ve kan şekeri normal seviyeye geldikçe pankreastan kana verilen insülin miktarı azalmış olur.

Tip 1 diyabette ise; pankreas adacık hücreleri tahrip olduklarından insülin üretilemez ve glukoz kullanılmak yerine kanda birikmeye başlar böylece glukoz miktarının aşırı yükselmesi ile diyabet koması (diyabetik ketoasidoz) gibi hayatı komplikasyonlar oluşur.

Tip 2 diyabette ise; vücut yeterli miktarda insülin salgılayamadığı için glukozun hücrelerin içine girmesi engellenir ve insülin direnci oluşur. Böylece kanda fazla miktarda şekerin birikmesi diyabet gibi hayatı tehdit eden komplikasyonlara sebep olabilir (48).

Diabetes Mellitus Tanı Sınıflama ve İzlem İlkeleri

Yetişkin bireyler; demografik ve klinik özelliklerine göre tip 2 diyabet risk faktörleri bakımından analiz edilmelidir (49).



Şekil 6. Erişkinlerde tip 2 diyabet taraması ve tanılama (49)

VKİ: Vücut kitle indeksi, APG: Açlık plazma glukoz, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, 2.stPG: OGTT'de 2.saat plazma glukoz, IGT: Bozulmuş glukoz toleransı, IFG: Bozulmuş açlık glukozu, A1C: Glikozillenmiş HbA1c, YRG: Yüksek risk grubu DM: Diabetes mellitus

Tip 2 DM dünya çapında son on yılda artmış durumdadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yetişkinlerin yaklaşık olarak % 8'i etkilenmektedir (50). Diyabet, gelişmekte olan ülkeler de %5 iken bu oran gelişmiş ülkeler de %10'dur. Diyabete bağlı olarak hastalık ve ölüm oranı giderek artmaktadır. 40-49 yaşları arasında diyabet olan kişiler de 7-10 yıl iken bu oran 60-69 yaşları arasında 3-5 yıl yaşam süresini azaltmaktadır (51).

Türkiye'de DM'nin sıklığı ise; Türk Yetişkin Risk Faktör Çalışması (TEKHARF) ve Türkiye diyabet epidemiyoloji projesi (TURDEP)'ne göre obezite ile birlikte beklenmeyen şekilde artış gözlenmiştir (52-54).

4.6. Koroner arter hastalığı (KAH)

Koroner arterlerin aterosklerozun etkisinden dolayı daralması veya tıkanması sonucu oluşan klinik sendromdur. Koroner damarlarda, kolesterol ve kalsiyum gibi maddelerin birikmesi sonucu damarlarda daralma ve tıkanma meydana gelir bunun sonucu olarak da; kalbin beslenmesi, kasılması ve ritmik çalışmasında sorunlar olur, gerekli önlemler alınmazsa miyokart enfarktüsüne neden olabilir.

TEKHARF çalışması' na göre; ülkemizde yılda yaklaşık olarak 230 bin yeni koroner hastalığı meydana geldiği ve hastalık sonucunda yaklaşık 61.000 kadının ve 66.000 erkeğin hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir (55).

Kardiyovasküler hastalıklar 20.yy'da dünyada meydana gelen ölümlerin yaklaşık olarak %10'undan sorumlu iken, 21.yy'da ise gelişmiş ülkelerde ölümlerin yaklaşık olarak yarısında gelişmekte olan ülkelerin ise %25'inden sorumlu olmaktadır. 2020 yılında ise; koroner kalp hastalığının dünyada bir numaralı ölüm ve sakatlık nedeni olabileceği öngörülmektedir (56).

Dislipidemi ile KAH arasındaki bağlantı bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır. HDL-K'ün azalması ve LDL-K'ün artması ile risk artış göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; TG yüksekliği, Enflamasyon belirteçleri gibi yeni koroner risk faktörleri aterosklerozun başlangıcında ve ilerlemesinde önemli roller oynamaktadır (57,58).

Ateroskleroz (damar sertliği) vücut atardamarlarında görülen bir hastalıktır. Kalp, beyin, böbrek, göz ve bacak atardamarlarında sık görülmektedir. Ateroskleroz sonucu koroner damarlarda tıkanma olur, kalp kasına yeterli miktarda kan ulaşamaz ve buna bağlı olarak kalp kası işlevlerini yerine getiremediği için etkilenen organa göre ciddi hastalıklar ortaya çıkabilir.

Amerikan Kalp Derneği (AHA)'ne göre sınıflandırılması; sekiz tipe ve 5 evreye ayrılmıştır (59).

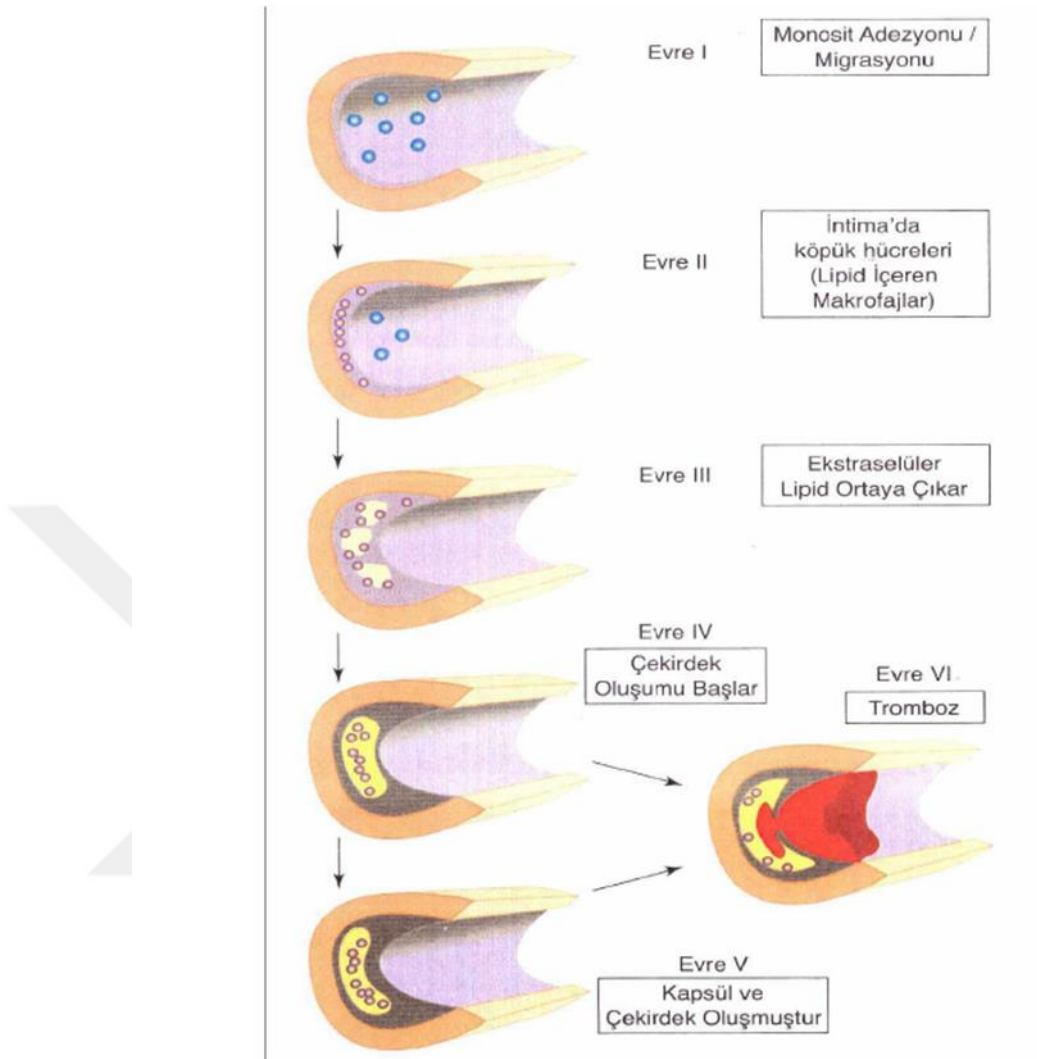
Evre 1; küçük bir lezyondur ve Tip I-III lezyonlar bu evreye girer.

Evre 2; bu evrede bir aterom plağı meydana gelmiştir. Hücre dışı birikintilerin birleşerek lipid çekirdek oluşturması sonucu İntimanın temel yapısı bozulmuştur.

Evre 3; trombüs oluşur.

Evre 4; tip VI lezyonlar vardır. Tip VI lezyon, trombüs içeren bir lezyon olup evre 3'tekilerden farkı ise trombüsün büyüklüğüdür.

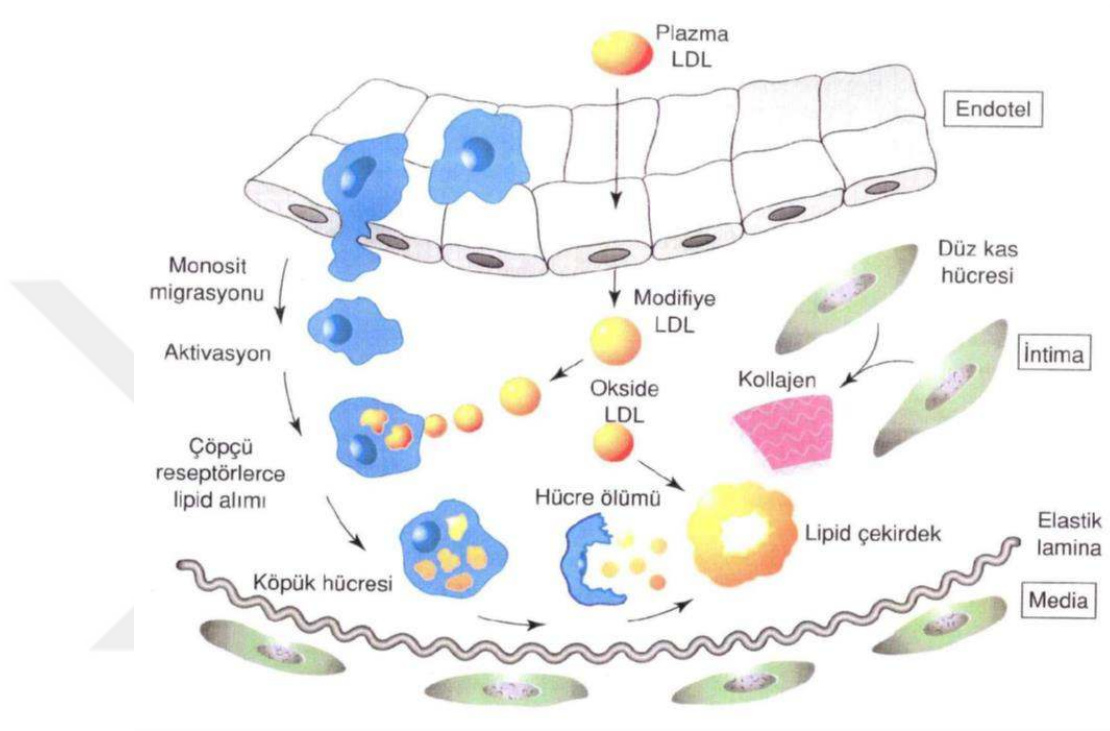
Evre 5; evre 3 ve 4 ün etkileri bir arada görülür.



Şekil 7. Amerikan Kalp Derneği'ne göre plak evreleri (59)

İlk oluşan lezyon Tip I lezyon'dur ve monositler endotel yüzeyine yapışarak arter lümeninden intimaya geçer. Tip II lezyon, lipidlerin makrofajlar tarafından alınması ile yağlı çizgilenmeler şeklinde köpük hücreleri oluşur. Aterosklerotik plak olarak tanımlanan Tip III lezyon, Tip II'den farklı olarak köpük hücrelerinin yanı sıra ekstrasellüler lipid birikimlerinin de olmasıdır. Tip IV lezyon, ekstrasellüler lipid miktarı artarak lipid çekirdeği oluşturur. Tip V

lezyon, bağ dokusundan oluşan fibröz doku oluşur. Tip VI lezyon, trombüs içeren lezyondur. Tip VII plaklarda yoğun kalsifikasyon vardır. Tip VIII plakların neredeyse tümü kollajen ve düz kas hücrelerinden oluşur. İlk 4 evre erken evre son 4 evre ise geç evredir (60).



Şekil 8. Temel Ateroskleroz Süreci

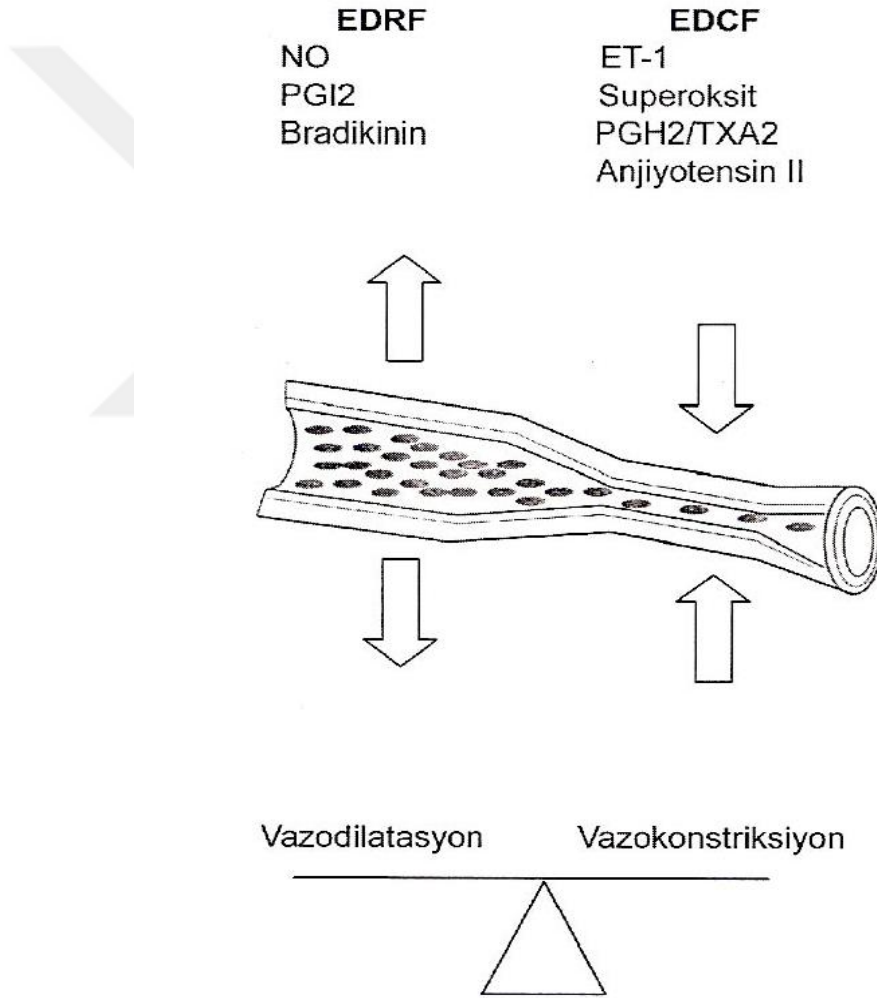
Lipoprotein partikülleri okside olarak modifiye olur ve intimada birikir. Okside olan LDL, makrofajlar tarafından yağ lezyonları şeklinde köpük hücreleri oluşur. Makrofajların yok olmasıyla lipidler açığa çıkarak çekirdeği oluştururlar (59).

4.7. Endotel Disfonksiyonu

Son zamanlarda, endotel fonksiyonu damar sağlığı ve hastalığı çalışmalarında ki önem artış göstermiştir. Endotel vasküler dengede, vasküler tonüs düzenlenmesinde, vasküler düz kas hücre poliferasyonu, trans-endotelial

lökosit göçü, tromboz ve trombolizis dengesinde önemli rol oynar. Endotel hücreler çok sayıda vazoaaktif maddelerin sentezi ve yayılması, büyüme modülatörleri ve diğer faktörler bu işlevlerin gerçekleşmesini sağlar (61).

Endotel disfonksiyon; vazodilator ve vazokonstriktör arasındaki dengenin kısmi yada tamamen bozulması, büyümenin desteklenmesini engelleyen faktörler, proaterojenik ile anti-aterojenik faktörler ve pro-koagulan faktörler olarak tanımlanabilir (61).



Şekil 9. Endotel tabakasının görevini yerine getirebilmesi için endotel kaynaklı kasıcı (EDCF) ve endotel kaynaklı gevşetici (EDRF) maddelerin dengede olması gerekir (62).

Endotel disfonksiyonda ilk gerçekleşen olay Nitrik oksit (NO) ile vazodilatasyonun bozulmasıdır. NO aktivitesinde ki bozukluk sonucu; KAH, HT, kalp yetmezliği, MetS, DM, obezite gibi bir çok hastalığın oluşmasına sebep olur ve aterosklerotik sürecin ilk evresinde gerçekleşir ve klinik olarak koroner arterlerde aterosklerotik plaklar tanımlanabilir. Ayrıca diyabette ki mikrovasküler komplikasyonları gelişiminde önemli bir olay olarak kabul edilmiştir (63-66).

Ludmer ve ark asetilkolin testi kullanılarak yaptıkları çalışmada, aterosklerozun olduğu durumlarda endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulması insanlarda ilk kanıt olarak ispatlanmıştır (67).

Koroner arterdeki endotel disfonksiyon, koroner dolaşımda ki endotel disfonksiyonu ile oldukça ilişkili olup kardiyovasküler risk faktörü için bağımsız bir risk olarak ortaya çıkmaktadır (68).

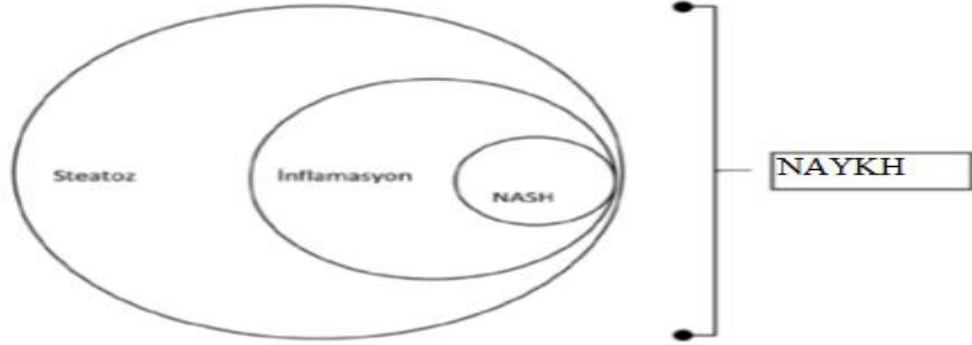
Endotel fonksiyonun endotelial aktivitelerinin markerlarının plazma seviyelerini ölçmek için; çözünür vasküler hücre adezyon molekülü (sVCAM), çözülen hücreler arası yapışma molekülü (sICAM), endotelin 1 (ET-1), E-selectin ve diğerleri, PAI-1, doku plazminojen aktivatör, ya da von Willebrand faktör (vWF) gibi koagülasyon/fibrinolizis'in markerları, C-Reaktif protein (CRP), IL-6, IL-1 ve TNF- α gibi düşük dereceli inflamasyon markerları kullanılır.

4.8. Non-alkolik yağlı karaciğer (NAYKH)

Non-alkolik karaciğer hastalığı, çok az yada hiç alkol tüketmeyen bireyler de alkol kaynaklı karaciğer hastalığı histolojik bir hastalıktır. Bu tanım, kendi içerisinde bazı alt grupları içerir.

1. Steatoz: (Nonalkolik karaciğer yağlanması): Karaciğerde yağlanma görülürken iltihabi infiltrasyon yoktur.

2. Nonalkolik steatohepatit (NASH): Karaciğerde yağlanma ile birlikte iltihabi infiltrasyonun olduğu hastalıktır (69).



Şekil 10. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının klinik spektrumu (69)

NAYKH'nın başlangıcı trigliserid sentez ve yıkımı arasındaki dengenin bozulmasıdır. Genel nüfusun %3 ile %25'ini etkiler. NASH'li hastaların %40'ında diyabet, %20'sinde ise bozulmuş glukoz toleransı olduğu görülmüştür. Diyabetli hastaların yaklaşık %50'sinde non alkolik karaciğer hastalığı ve bu hastaların %20'sinde de NASH olduğu ve tedavisinin obezite ve insülin direncine yönelik olduğu saptanmıştır (70). Histolojik olarak NAYKH aralıkları basit yağlanmadan steatohepatit (NASH), fibroz, siroz ve hepatosellüler kansere kadardır (71,72).

NAYKH genellikle obezite, tip 2 diabetes mellitus, hiperlipidemi, çölyak hastalığı, çeşitli ilaçlar ve toksinler ve cerrahi yöntemlere maruz kalma gibi birçok hastalık ile ilişkilidir (73-75).

NAYKH'nın patofizyolojisinde 2 adımın gerekli olduğuna inanılır. İlk adım yağlanmanın gelişmesine neden olan insülin direncidir. İkinci adım NASH'e neden olan ve enflamatuara cevap veren oksidatif strestir (76-78). İnsülin direnci,

oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon gibi faktörler NAYKH'ın ilerlemesinden sorumludur (70). Sanval ve arkadaşlarının NASH ile ilgili yapmış oldukları bir çalışmada, SYA'ların artmış mitokondiyal β -oksidasyonun SOR kaynağı için önemli olabileceğini vurgulamışlar (79).

4.9. Polikistik over sendromu (PCOS)

PCOS, ilk defa 1935'de Dr. Stein ve Dr. Leventhal tarafından obezite, polikistik overler, hirsutizm birlikteliği şeklinde tanımlanır. En sık olarak doğurganlık çağındaki kadınlarda görülür ve prevalansı yaklaşık %6-8 olan endokrin bir bozukluktur (80).

Polikistik over sendromunun patogenezindeki anahtar rol; insulin direnci ve overlerde luteinizan hormona bağımlı androjenin artışıdır. PCOS'nin insülin ile olan ilişkisi nedeniyle tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalığın gelişme riski artmış durumdadır. Kırklı yaşlardaki polikistik over sendromlu kadınların yaklaşık %40'ında bozulmuş glukoz tolerans testi gözlenmiştir (81-83). İnsülin duyarlılığını artıran ajanlar ve yaşam tarzı değişimleri ile tedavide olumlu sonuçlar alınmaktadır.

4.10. Subklinik İnflamasyon

Subklinik inflamasyon MetS'da önemli rol oynar. İnsülin direncinde ve aterosklerozun ilerlemesinde önemli rol almıştır. Abdominal obezite, HDL-düşüklüğü, trigliserid yüksekliği ve kan glukozu gibi MetS bileşenleriyle yakın ilişkisi vardır (4).

1. Adiposit Yağ Asidi Bağlayıcı Protein (AFABP)

Yağ asidi bağlayıcı protein (FABP)'ler doymuş ve doymamış uzun zincirli yağ asitleri, eikosanoidler ve diğer lipidleri yüksek affiniteyle bağlanan

sitoplazmik proteinlerdir (84,85). İlk kez 1972 de keşfedilmiştir ve dokuz adet doku spesifik sitoplazmik FABP tanımlanmıştır. Bunlar L (karaciger), H (kas ve kalp), A (adiposit), I (intestinal), E (epidermal), Il (ileal), M (miyelin), B (beyin), ve T (testis)'dir (84,86,87).

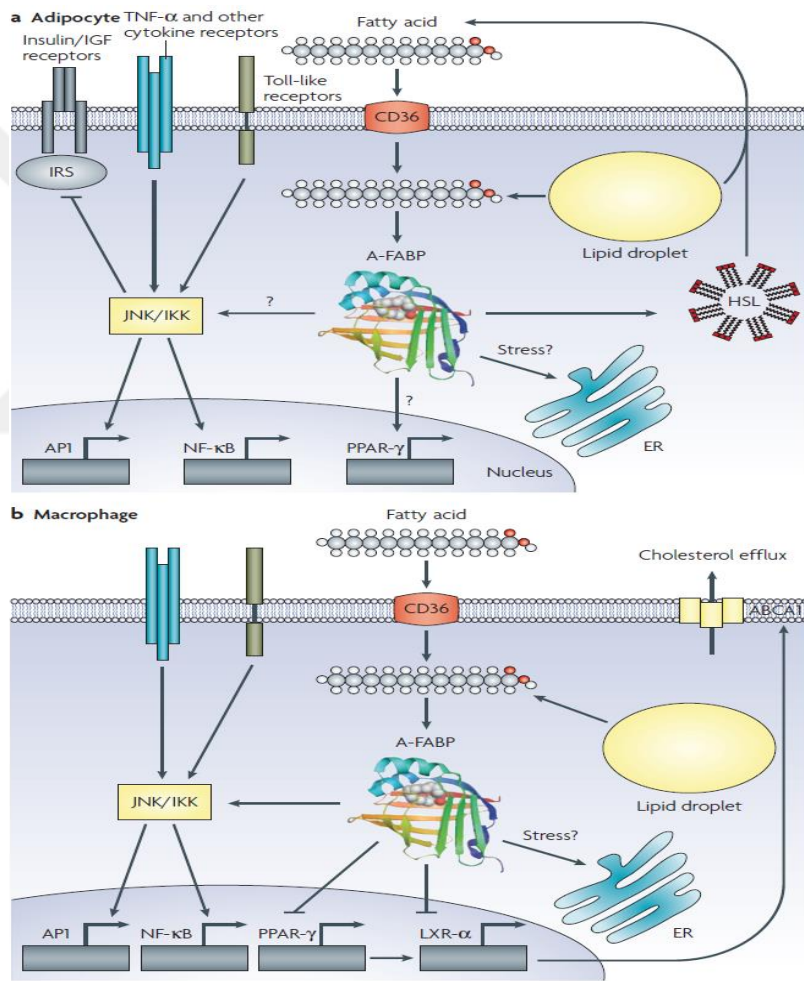
AFABP, yağ asidi bağlayıcı protein süper ailesine ait olup molekül ağırlığı 14-15 kDa'dur. AFABP baskın sitozolik bir proteindir, total proteinin yaklaşık %6'sını oluşturur ve sistemik insülin direnci, lipid ve glukoz metabolizmasının önemli bir düzenleyicisidir (88). AFABP, yağ asitleri için taşıyıcı bir proteindir. Ayrıca aP2 ve FABP4 olarak adlandırılır. Özellikle adiposit ve makrofajlarda ifade edildi. AFABP serum konsantrasyonları çeşitli çalışmalarda damar hastalıkları ve metabolik sendromun markerları ile olumlu bir şekilde ilişkilidir.

Yağ asidlerinin intrasellüler alıcısı olan yağ asidi bağlayıcı proteinlerin, PPAR (Peroksizom proliferatör-aktive reseptörler)'ların ligand bağımlı transaktivasyonu üzerine etkisi vardır. PPAR'ların tanımlanmış 3 grubu var, PPAR α , PPAR β ve PPAR γ 'dır. A-FABP'in yağ asitleri, PPAR γ ve insülin tarafından regüle edildiği adipositlerle yapılan invitro çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (89).

AFABP eksikliği olan fareler de makrofajlarda kolesterol çıkışı arttığı için hiperinsülinemi, hiperglisemi ve insülin direnci gelişiminden korunmalıdır (88).

AFABP'in MetS, kronik inflamasyon ve obezite ile olan ilişkisi ve eksikliğinde TNF- α , IL1- Beta ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve COX2 gibi proinflamatuvar enzimlerin üretiminin baskılandığı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (84,90,91).

AFABP, dolaşımda bol miktarda bulunduğu halde biyolojik olarak aktif olup olmadığı kanıtlanmamıştır. AFABP eksikliği olan fareler den elde edilen adipositlerde lipolizisin invitro ve invivo etkinliği azalmıştır (92,93). Bu çalışma başlangıçta AFABP'ı bağlama ve hormona duyarlı lipaz (HSL)' yi aktive etme yeteneğine katkı sağlamamıştır. Ancak AFABP ve HSL aktivasyonu arasında ki ilişki invivo da ıspatlanmamıştır. Ayrıca AFABP eksikliğinde lipolizisteki değişikliklerin potansiyel mekanizma olup olmadığı görülebilir.



Şekil 11. Adiposit ve makrofajda ki AFABP'ın rolü (84)

AP1: Adaptor Protein 1, IGF: İnsülin-benzeri büyüme faktörü, LXR: Liver X Reseptör, IRS: İnsülin Reseptör Substratı, TNF: Tumor Necrosis Factor, ER: Endoplazmik Retikulum JNK: c-Jun N-terminal kinases, İKK: Kappa Kinaz İnhibitörü

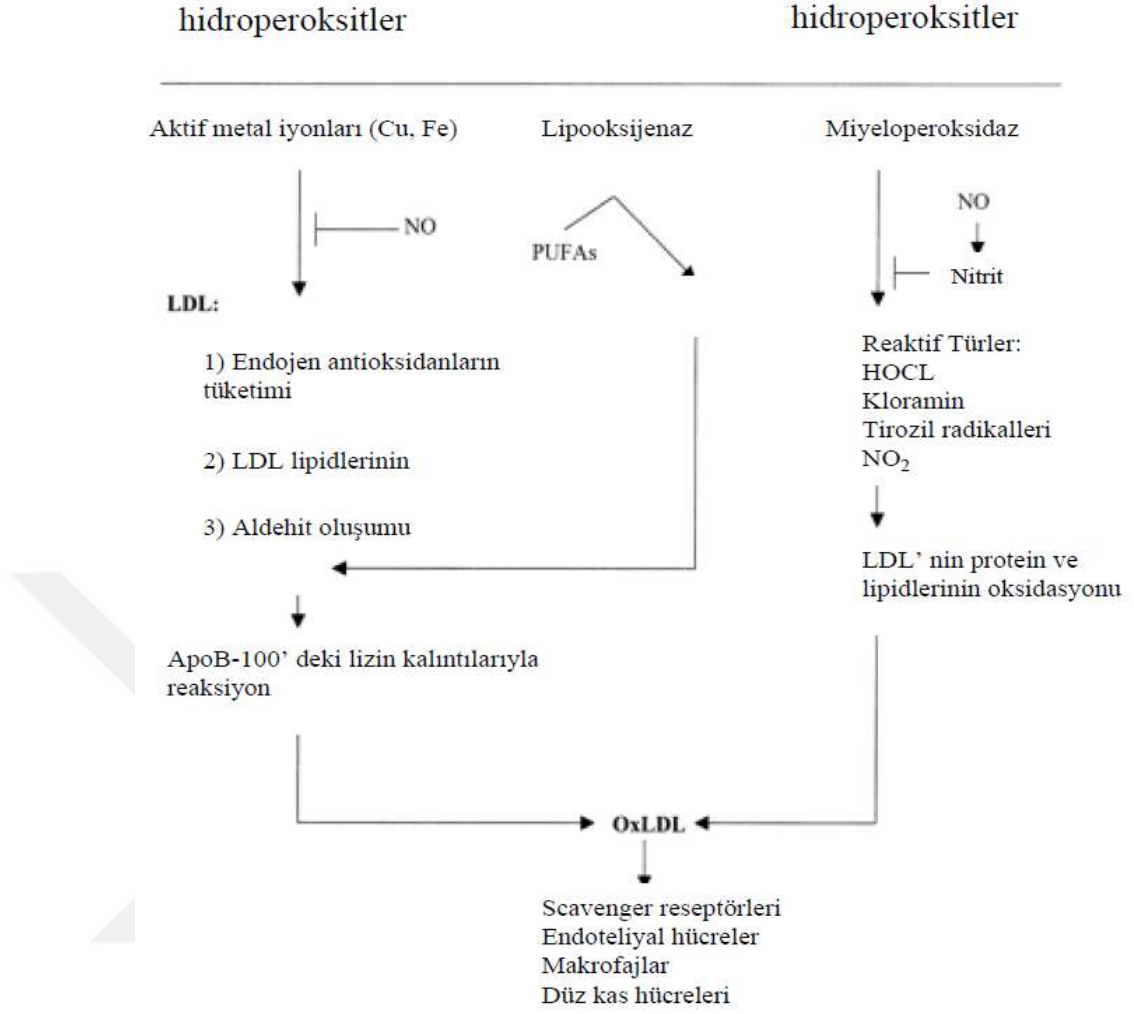
FABP'nin genel işlevi AFABP'nin HSL ile etkileşerek katalitik etkisini düzenlemektir. Adipositte ki ve insülin aktivitesinin inhibitörü JNK/İKK adipositteki insülin aktivitesinin aracılığıyla enflamatuvar yanıtları kontrol eden çok sayıda sinyal ağını birleştirir. AFABP, adiposit lipid hormonu üretimi kontrolünde önemli işlevlere sahiptir (84). AFABP, makrofajlarda ise İKK/NF-Kb yolu ile hem enflamatuvar yanıtları kontrol etmede hem de PPARg'nın ve LXR inhibisyonu üzerine etkilidir. Hem makrofaj hem de adipositler de AFABP özellikle Endoplazmik Retikulumda (ER) organellere yanıt veren lipid sinyallerini birleştirmede önemli rol oynar (84,94). AFABP, metabolik ve inflamatuvar yolların integrasyonunu sağlayarak MetS bileşenleri arasında anahtar bir rol oynamaktadır (95). *İn vitro* çalışmalarda AFABP ekspresyonunun; yağ asitlerinde, PPAR-g, TZD (Tiazolidinedionlar) ve insülin direnci üzerin de olumlu düzenlemelerinin olduğu görülmektedir, bu çalışmalar obez ratlar üzerinde de kanıtlanmıştır (96-101).

2. Okside-LDL (OX-LDL)

LDL, serbest radikalın etkisi ile modifiye olur ve oksidasyon hem hücre içi hem de hücre dışında gerçekleşmektedir. LDL miyeloperoksidaz, reaktif nitrojen türleri, metal iyonlarıyla veya lipooksijenaz ile okside olabilmektedir.

LDL'nin metal iyonlarıyla oksidasyonu 3 aşamadan oluşur;

1. Antioksidan miktarının azalması
2. Lipid peroksidlerinin oksidasyonu
3. Aldehit ürünlerin oluşması (102).



Şekil 12. LDL oksidasyon mekanizmaları (102)

NO₂: Nitrojen dioksit, NO: Nitrik oksit, HOCL: Hipokloröz asit

ApoB-100'de ki lizin kalıntılarıyla reaksiyona giren Aldehitler, LDL oksidasyonuna neden olurken NO ise; bakır metal iyonu ile meydana gelen oksidasyon üzerinde etkili olup inhibe eder. Lipooksijenaz ve miyeloperoksidaz enzimleri monosit/makrofaj hücrelerinde üretilir. Lipooksijenaz, lipid peroksidasyonunda önemli rol oynarken miyeloperoksidaz ise HOCL ve NO₂'i oluşturarak LDL proteinlerini ve lipidlerini oksitleyebilir (103).

OX-LDL, Scavenger ve CD36 reseptörleri ile hücre içine alınır (104-106). Hücre içinde ki kolesterol düzeyi reseptörler tarafından düzenlenmediği için makrofajlar büyük miktarda Ox-LDL'yi alarak köpük hücreyi oluştururlar (106-108). Ox-LDL aynı zamanda makrofajlar üzerinde kemostatik etki göstererek dolaşıma katılmalarını sağlayarak aterosklerotik sürecinin hızlanmasına etki eder (109).

Holvoet ve arkadaşlarının metabolik sendromlu hastalarda yaptıkları çalışmada ox-LDL'nin koroner kalp hastalığı riskinin bağımsız bir belirteci olmadığı, ancak yüksek okside LDL düzeylerine sahip olanların miyokard infarktüsüne daha yatkın oldukları sonucuna varılmıştır (110).

Derosa ve arkadaşlarının yaptıkları klinik çalışmada MetS'lu hastalarda pioglitazonun TZD grubu içinde en etkili ajan olduğu tespit edilmiştir. Tedavi sürelerinin 9 ve 12 ay olarak belirlendiği iki gruptan 12 ay pioglitazon verilen grupta daha belirgin olmak üzere açlık glukoz ve insülin düzeylerinde belirgin azalma olduğu gözlenmiştir. Yine TK, LDL -K, HDL-K ve TG düzeylerinde de önemli düzelme saptanmıştır (111).

3. Tribulus Terrestris (Demir Dikeni)

Dünyada kimyongiller ailesine ait yaklaşık 20 tür Tribulus vardır. Hindistan'da sık rastlanan Tribulus cistoides, Tribulus terrestris (TT) ve Tribulus alatus olmak üzere 3 türü vardır (112). Avrupa ve Afrika'nın güney kısmında, Asya'nın batı kısmında, Çin, Japonya, Kore'de yaygın olarak bulunan bir bitkidir. Demir dikenî adı dışında çoban çökerten, çarık dikenî, demir bıtırağı ve deve çökerten gibi isimler ile de anılmaktadır (113).



Şekil 13. Tribulus terrestris bitkisi (114)



Şekil 14. Tribulus terrestris meyvesi (114)

TT, çoğu ülkeler de birçok hastalık için halk ilacı olarak tanınmıştır. Geleneksel Çin tıbbında TT, koroner kalp hastalığını ve yüksek kan basıncını tedavi etmek için kullanılmıştır (115-117).

TT afrodizyak, antiurolithic, immünomodülatör, antihipertansif, antihiperlipidemik, antidiyabetik, hepatoprotektif, antikanser, antelmintik, antibakteriyel, analjezik ve anti-inflamatuvar gibi fitokimyasal ve farmakolojik etkileri için ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Bitki diüretik, antihiperlipidemik ve kardiyoprotektif aktivitelerinden dolayı etkili kan basıncı kontrolü için bitkisel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır (114).

TT, Antik Yunan ve Hindistan'da kozmetikte, Çin'de ise karaciğer ve böbrek rahatsızlıkları için kullanılmıştır. Kemikleri güçlendirmesi ve karaciğer tarafından belirli hormonları üretmek için kullanılan temel yağ asitlerinin emilimini kolaylaştırır aynı zaman da geleneksel tıpta, anti-inflamatuvar, anti-artrit etkileri ile bağışıklık sistemini güçlendirici ve böbrek taşı önleyici olarak da kullanılmaktadır (118,119).

Demir Diken Bitkisi İle Hayvanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Li ve arkadaşlarının 10 mg/kg/gün sulu tribulus ekstraktı kullanılarak yapılan çalışmada, kobay hayvanlar ile kontrol grubu kıyaslandığında tribulus terrestrisin antihipertansif etkilere sahip olduğu gözlenmiştir (120). Aynı araştırma grubunun sağlıklı kobay farelerini kullanarak yaptıkları bir başka çalışmada tribulus terrestris ekstraktının glikometabolizmi etkilediği, glukoneojenezisi belirgin şekilde düşürdüğü, total Kolesterol düzeylerini ve trigliserid seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Arcasoy ve arkadaşlarının Tribulustan izole edilen saponin bileşikleri kullanılarak yapılan çalışmada peristaltik hareketlerde belirgin azalmaya sebep olan doza bağlı antispazmatik aktivite elde edilmiştir (121). Hong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada COX-2 inhibisyon aktivitesi belirlenmiş olup antienflamatuvar olarak kullanılması önerilmiştir (122).

Philips ve ark. , fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; KCl kullanılarak artırılan kan basıncına karşı TT'in su ve metanol ekstraktlarının verilen doza bağlı oranlarda damar genişletici etkisi ve kan basıncının düştüğü gözlemlenmiştir. Su ile elde edilen ekstraktın metanol ile elde edilen ekstrakta oranla daha fazla damar gevşetici etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (123).

Grigorova ve ark. , demir diken (Tribulus terrestris) ticari kapsül ekstraktı ile beslenen beç tavuklarının yumurta sarısında fosfolipid, toplam lipid, kolesterol ve yağ asitleri; serumda kolesterol içeriklerini belirlemek için 12 hafta süresince 10 mg/kg demir dikeninin yeme karıştırılarak verilmesi sonucunda yumurta sarısının toplam lipid ve fosfolipid değerleri üzerine etkisinin olmadığını ancak 12 hafta süresince sadece 10 mg/kg demir diken ile beslenen hayvanların serumlarındaki ve yumurta sarısındaki total kolesterol düzeylerinin önemli derecede düştüğü ancak, yumurta sarısında linoleik asit miktarlarının arttığı gözlemlenmiştir (124).

Bu çalışmada, Tribulus terrestris'in, MetS oluşturulmuş ratlarda, AFABP ve Ox-LDL düzeyleri ile diğer biyokimyasal parametreler üzerine etkilerini araştırmak ve çalışma sonucunda elde edilecek veriler ile MetS ve tedavi süreci ile ilgili literatüre katkı sağlayabilmeyi hedefledik.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Deney Hayvanları ve Deneysel Çalışmasının Düzenlenmesi

Fırat Üniversitesi Deney hayvanları Çalışmaları Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra (Tarih: 08.01.2014 ve 01 nolu karar) çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun bir şekilde yapıldı.

Çalışmada, 8 haftalık yaklaşık 240-260 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi 21 rat kullanıldı. Ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi ve bakımları aynı merkezde yapıldı. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodunda 22-24 °C sabit ısıdaki odalarda barındırıldı.

Hayvanların beslenmesinde standart pellet yemi ve çeşme suyu kullanıldı. MetS oluşumu için % 10 oranında fruktoz kullanıldı (125).

Ratlar her bir grupta 7 rat olmak üzere üç gruba ayrıldı. Her bir grup 3'lü ve 4'lü bir şekilde kafeslere bırakıldı. Ratlara çalışma süresince standart rat diyeti, fruktoz (MetS oluşturmak için D-Fruktoz BioShop Canada inc.) ve Tribulus terrestris ekstratı oral olarak verildi.

Grup 1: Kontrol grubu 10 hafta boyunca standart beslenme uygulandı.

Grup 2: Fruktoz ile MetS oluşturulan grup 10 hafta boyunca standart beslenme ve %10 oranında fruktoz uygulandı.

Grup 3: MetS oluştuktan sonra 8 hafta boyunca Tribulus terrestris bitki ekstratı verilen grup.

Deney süresi boyunca ratların ağırlıkları haftalık olarak ölçülüp kaydedildi. Deney sonunda (Grup 1, 2 deney başlangıcından 10 hafta sonra, Grup

3, 18 hafta sonra) tüm ratlar dekapite edildi ve çalışmanın sonuçlarının inceleneceği parametreler için uygun kan ve doku örnekleri alındı.

5.2. Tribulus terrestris Bitkisinin Hazırlanış ve Uygulama Şekli

Tribulus terrestris ekstratı su ile çözünerek hazırlandı. Çalışma gruplarından Tribulus terrestris ekstratı verilen gruplara, 2 g/kg vücut ağırlığı dozunda bitki ekstratı oral yoldan verildi (126).

5.3. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması

Biyokimyasal incelemeler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvar'ında yapıldı. Deney hayvanlarından alınan kan örnekleri aprotininli ve düz biyokimya tüplerine alınarak serum ve plazma örnekleri elde edilerek bu örnekler çalışılncaya kadar -80°C de saklandı. ELİSA ve Western Blot çalışmalarında kullanılmak üzere karaciğer ve abdominal bölge yağ dokusu alındı. Alınan doku örnekleri fosfat tamponu içeren çözültiden geçirildikten sonra analiz gününe kadar -80 C' de saklandı.

5.4. Dokuların Homojenizasyonu

Çalışmadan önce kontrol, MetS ve MetS + TT gruplarına ait karaciğer ve yağ dokuları için toplamda 40 tane eppendorf her grup için ayrı ayrı adlandırıldı. Daha sonra numaralandırılmış eppendorflara RİPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) içerisinde bulunan RİPA Lysis Buffer'dan her bir eppendorfa 600'er µL eklendi. Bunların üzerine de 10 µL PMSF solüsyonundan, 10 µL Na-orthovanadate solüsyonundan ve 10 µL protease inhibitör koktail solüsyonundan olacak şekilde her bir eppendorfa konuldu. Çalışma günü gruplara ait dokular -80°C'den alındıktan sonra herbir grubun karaciğer ve yağ dokuları 200 mg olacak şekilde tartıldı. Bu dokular steril bistüriler ile ince parçalar halinde

kesildikten sonra daha önce hazırlanan numaralandırılmış eppendorflara yerleştirildi. Bunların üzerine de yaklaşık 100 µL 0,5 mm zirconium oxide boncuklardan konuldu. Hazırlanan bu örnekler Bullet Blender Homojenizasyonuna (Next Advance, Inc, USA) yerleştirildi. Cihazın hızı 8, süresi 3 dk olacak şekilde ayarlanıp çalıştırıldı. Bullet Blender Homojenizasyon cihazından alınan örnekler +4 °C'de 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrı eppendorflara alındı. Bu hazırlanan süpernatantlar ELİSA ve Western Blot çalışmalarında kullanıldı.

5.5. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Rutin biyokimyasal analizler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi merkez laboratuvarında yapıldı (Glukoz, HDL-K, LDL-K, TK, TG). Ox-LDL, IL-6, TNF-α ve insülin düzeyleri ticari kitler kullanılarak ELISA yöntemiyle çalışıldı. Fırat Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan Bio-tek Elx50 (BioTek Instrument, USA) marka otomatik plate yıkama cihazı sayesinde yıkama işlemleri gerçekleştirilip, Bio-tek Elx800 (BioTek Instrument, USA) marka ELİSA plate okuyucusunda okutuldu.

$HOMA-IR = \text{Açlık glukoz düzeyi (mmol/L)} \times \text{Açlık insülin düzeyi (µU/mL)} / 22,5$ olarak hesaplanmış olup insülin direnci için eşik değer; $HOMA-IR > 2,5$ olarak kabul edilmiştir (23, 25, 26).

Serum Ox-LDL düzeyleri Ox-LDL Elisa kiti (YH Biosearch laboratory, katalog no:YHB0817Ra) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı ve sonuçlar µg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: 0,016 µg/ml, ölçüm aralığı: 0,03-9 µg/ml, intra-assay Coefficient of variation (CV): < %10, inter-assay CV:<%12 'dir.

Serum IL-6 düzeyleri sıçan IL-6 Elisa kiti (YH Biosearch laboratory, katalog no:YHB0630Ra) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm’de alındı ve sonuçlar ng/L olarak verildi. Kit sensitivitesi: 2,49 ng/L, ölçüm aralığı: 5-1000 ng/l,intra-assay Coefficient of variation (CV): < %10, inter-assay CV:<%12 ‘dir.

Serum TNF- α düzeyleri sıçan TNF- α Elisa kiti (YH Biosearch laboratory, katalog no:YHB1098R2) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm’de alındı ve sonuçlar ng/L olarak verildi. Kit sensitivitesi: 2,51 ng/L, ölçüm aralığı: 5-1000 ng/l, intra-assay Coefficient of variation (CV): < 3,3, inter-assay CV:<6,9 ‘dir.

Serum insülin düzeyleri sıçan insülin Elisa kiti (Sunred, katalog no:CUS10016) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm’de alındı ve sonuçlar mIU/L olarak verildi. Kit seviyesi: 0,102 mIU/L, intra-assay Coefficient of variation (CV): < %10, inter-assay CV:<12 ve ölçüm aralığı: 0,2-40 mIU/L’dir.

Tablo 2. ELİSA çalışması için gerekli cihaz ve malzeme listesi

-
- 1) ELİSA yıkayıcısı, okuyucusu ve yazıcısı
 - 2) 10-100-1000 mikrolitre hacimleri alabilecek nitelikte otomatik pipetler ve pipet uçları
 - 3) 100 mikrolitrelik 8 kanallı otomatik pipetler ve pipet uçları
 - 4) İnkübatör
 - 5) Standartları hazırlamak için eppendorf tüpler
 - 6) 100 ve 500 mL’lik beher ve erlenmayerler
 - 7) Kurutma kağıdı
 - 8) Distile su
 - 9) Vorteks
 - 10) Benmari
-

AFABP’ da Western Blot kiti (İnvitrogen, katalog no:WB7103, WB7105, WB7107) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı.

5.6. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplarda elde edilen veriler Ortalama±Standart sapma olarak verildi. Gruplardaki verilerin değerlendirilmesinde gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p<0,05$ değeri kabul edildi.



6.BULGULAR

6.1 Bazal ve Haftalık Ağırlık Ölçümleri

Elde edilen verilere göre ilk ve son ağırlıklar ağırlık ortalaması açısından değerlendirildiğinde grup 2'nin grup 1'e göre sayısal değer olarak arttığı gözlemlendi (10 hafta uygulama). Grup 3 ile uygulanan TT ekstraktının (8 hafta) diğer gruplara göre ve özellikle grup 2' de ki ağırlık artışını durdurduğu gözlemlenmiştir (Tablo 3).

Gruplar arasında sıçan ağırlıkları arasındaki ilişki tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Gruplara Ait Sıçan Ağırlıkları Farkı

Gruplar	Ağırlıklar Bazal Değerler	Ağırlıklar Son Değerler	Ağırlıklar Arası Fark	P
Grup 1	235,42	344,85	109,42±19,74	p<0,05
Grup 2	238,85	383,57	144,71±34,66	p<0,05
Grup 3	235,42	346,42	111,00±40,28	p<0,05
p	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

6.2. Biyokimyasal Ölçümler

6.2.1. Rutin Biyokimya Testleri, Lipid profili, Açlık Kan Glukozu Düzeyleri

Çalışma sonucu elde edilen verilere göre biyokimya testleri, lipid profili ve açlık kan glukozu düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Serum glukoz düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna (99,00±10,7 mg/dl) göre, MetS oluşturulan grupta (124,30±12,68 mg/dl) anlamlı olarak bir

artış gözlemlendi ($p<0,01$) (**Tablo 4**). TT ekstraktının uygulandığı 3.grupdaki ($108,74\pm9,36\text{mg/dl}$) glukoz düzeylerinde ise MetS oluşturulan 2.gruba kıyasla düşüş görülmesine rağmen istatistiksel anlamda farklılık gözlemlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 4. Deney Sonu Serum Glukoz, Lipid Parametreleri, İnsülin ve HOMA-IR Düzeyleri

	Grup 1 (n=7)	Grup 2 (n=7)	Grup 3 (n=7)	P
Glukoz (mg/dl)	99,00 $\pm$ 10,7	124,30 $\pm$ 12,68	108,74 $\pm$ 9,36	Grup 1-2 $p<0,01$
T. Kolesterol (mg/dl)	64,59 $\pm$ 5,80	85,21 $\pm$ 8,91	76,28 $\pm$ 3,30	Grup 1-2 $p<0,01$
Trigliserit (mg/dl)	57,14 $\pm$ 7,08	93,7 $\pm$ 9,80	83,91 $\pm$ 3,63	Grup 1-2 $p<0,01$
HDL (mg/dl)	15,41 $\pm$ 1,84	12,25 $\pm$ 1,75	13,91 $\pm$ 1,25	Grup 1-2 $p<0,01$ Grup 2-3 $p<0,05$
LDL (mg/dl)	37,75 $\pm$ 5,72	54,21 $\pm$ 7,90	45,58 $\pm$ 2,33	Grup 1-2 $p<0,01$ Grup 2-3 $p<0,05$
Ox-LDL ($\mu\text{g/ml}$)	2,71 $\pm$ 0,44	3,98 $\pm$ 0,44	3,51 $\pm$ 0,186	Grup 1-2 $p<0,01$ Grup 2-3 $p<0,05$
TNF- α (ng/L)	464,29 $\pm$ 30,54	587,58 $\pm$ 49,24	550,26 $\pm$ 30,16	Grup 1-2 $p<0,01$
IL-6 (ng/L)	417,99 $\pm$ 30,54	605,59 $\pm$ 30,29	585,78 $\pm$ 36,23	Grup 1-2 $p<0,01$
İnsülin (mIU/L)	8,10 $\pm$ 0,65	10,18 $\pm$ 0,55	8,71 $\pm$ 0,56	Grup 1-2 $p<0,01$ Grup 2-3 $p<0,01$
HOMA-IR	1,96 $\pm$ 0,12	3,12 $\pm$ 0,30	2,34 $\pm$ 0,28	Grup 1-2 $p<0,01$ Grup 2-3 $p<0,01$

Grup1: Kontrol, Grup2: Fruktöz(MS), Grup3: MS+TT ekstraktı

Serum total kolesterol düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna ($64,59\pm5,80\text{ mg/dl}$) göre, MetS oluşturulan grupta ($85,21\pm8,91\text{ mg/dl}$) anlamlı

olarak bir artış gözlemlendi ($p<0,01$). TT ekstraktının uygulandığı 3.grupdaki ($76,28\pm3,30$ mg/dl) total kolesterol düzeylerinde ise MetS oluşturulan 2.gruba kıyasla istatistiksel anlamda farklılık gözlemlendi ($p<0,01$). TT ekstraktının uygulanmış olduğu grup 3'te MetS ile yükselmiş kolesterol değerinin düşük çıktığı görülmüştür (Tablo 4).

Serum trigliserid düzeyleri; grup 2' de ($93,73\pm9,8$ mg/dl) kontrol grubuna ($57,14\pm7,08$ mg/dl) ve MetS oluşumu sonrası TT ekstraktı verdiğimiz grup 3'e ($83,91\pm3,63$ mg/dl) göre anlamlı olarak ($p<0,01$) yüksek bulundu. Kontrol grubu; grup2 ve grup 3'e göre anlamlı olarak ($p<0,01$) düşük bulundu. Gruplar kendi aralarında kıyaslandıklarında da anlamlı istatistiksel farklılıklar olduğu görülmektedir (Tablo 4).

Serum HDL kolesterol düzeyleri; MetS oluşturulmuş grup 2'de ($12,25\pm1,75$ mg/dl), kontrol grubuna ($15,41\pm1,84$ mg/dl) göre anlamlı bir şekilde istatistiksel düşüş görülmüştür ($p<0,01$). TT ekstraktı verdiğimiz grup 3'de ($13,91\pm1,25$ mg/dl) grup 2' ye göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Grup3 ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan farklılık olmamıştır ($p>0,05$). Gruplar kendi aralarında kıyaslandıklarında da anlamlı istatistiksel farklılıklar olduğu görülmektedir (Tablo 4).

Serum LDL kolesterol düzeyleri; MetS oluşturulan grup2'de ($54,21\pm7,90$ mg), kontrol grubuna ($37,75\pm5,72$ mg/dl) göre anlamlı bir şekilde istatistiksel düşüş görülmüştür ($p<0,01$). MetS oluşturulduktan sonra TT ekstraktı verdiğimiz grup 3 ($45,58\pm2,33$ mg/dl) kontrol grubuna göre istatistiksel artış gözlemlendi ($p<0,05$). MetS ve Grup3 arasında anlamlı bir azalış gözlenmiştir

($p<0,05$). MetS oluşumu sonucu LDL kolesterol düzeyindeki artışın TT ekstraktının tedavisiyle kontrole yakın bir değere döndüğü görülmüştür (Tablo 4) .

Serum Ox-LDL düzeylerikontrol grubuna ($2,71\pm0,44\text{ug/ml}$) göre, MetS oluşturulan 2.grupta ($3,98\pm0,44\text{ug/ml}$) ve TT ekstraktı verdiğimiz 3. Grupta ($3,51\pm0,186\text{ug/ml}$) anlamlı bir artış gözlendi ($p<0,05$). MetS oluşturulan 2. Grup ($3,98\pm0,44\text{ug/ml}$), TT ekstraktı verdiğimiz grup 3 ($3,51\pm0,186\text{ug/ml}$) 'e göre anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$) .

Serum TNF- α düzeylerikontrol grubuna ($464,29\pm30,54\text{ ng/L}$) göre, MetS oluşturulan 2.grupta ($587,58\pm49,24\text{ ng/L}$) ve TT ekstraktı verdiğimiz 3. Grupta ($550,26\pm30,16\text{ng/L}$) anlamlı bir artış gözlendi ($p<0,01$) (Tablo 5). MetS oluşturulan 2. Grup ($587,58\pm49,24\text{ ng/L}$), TT ekstraktı verdiğimiz grup 3 ($550,26\pm30,16\text{ng/L}$) 'e göre anlamlı olmayan bir düşüş görülmüştür ($p>0,05$) .

Serum IL-6 düzeyleri kontrol grubuna ($417,99\pm30,54\text{ ng/L}$) göre, MS oluşturulan 2.grupta ($605,59\pm30,29\text{ ng/L}$) ve TT ekstraktı verdiğimiz 3. Grupta ($585,78\pm36,23\text{ ng/L}$) anlamlı bir artış gözlendi ($p<0,01$) (Tablo 4). MetS oluşturulan 2. Grup ($605,59\pm30,29\text{ ng/L}$) , TT ekstraktı verdiğimiz grup 3 ($585,78\pm36,23\text{ ng/L}$) 'a göre anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür ($p>0,05$) .

Serum insülin düzeyleri kontrol grubuna ($8,10\pm0,65\text{ mIU/L}$) göre, MetS oluşturulan 2.grupta ($10,18\pm0,55\text{ mIU/L}$) anlamlı bir artış gözlenirken ($p<0,01$) 3.grupta anlamlı olmayan bir artış gözlendi (Tablo 4). TT ekstraktı verdiğimiz grup 3'daki ($8,71\pm0,56\text{ mIU/L}$) insülin düzeyleri MetS oluşturulan 2.gruba kıyasla anlamlı bir azalış gözlendi ($p<0,01$). Gruplar kendi aralarında kıyaslandıklarında da anlamlı istatistiksel farklılıklar olduğu görülmektedir.

HOMA-IR düzeyleri kıyaslandığında ilk göze çarpan kontrole ($1,96 \pm 0,12 \text{ mg/dl}$) kıyasla 2. gruptaki ($3,12 \pm 0,30 \text{ mg/dl}$) artış istatistiki açıdan anlamlıdır ($p < 0,01$). MetS grubuna kıyasla TT ekstraktı uygulanan grup 3'de ($2,34 \pm 0,28 \text{ mg/dl}$) de istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p < 0,01$). Kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artışın gözleendiği tedavi grubu olan TT grubuyla istatistiksel olarak düşüş göstermiştir ($p < 0,05$). Gruplar kendi aralarında kıyaslandıklarında da anlamlı istatistiksel farklılıklar olduğu görülmektedir.

6.2.2 Western Blot Analizi

Bilimsel çalışmalarda proteinleri ayırmak ve tanımlamak için kullanılan bir metottur. Bu teknikte bir protein karışımı içeren örnekler jel elektroforezi yardımıyla proteinlerin moleküler ağırlıklarına bağlı olarak ayrılma işlemi gerçekleştirilir. Ardından jeldeki proteinler bir destek membranına transfer edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilir. Çalışılan maddeye özgü spesifik antikor aracılığıyla membran inkübasyona bırakılır. Bağlı olmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama aşamalarından sonra bantlar görünür hale gelir.

Çalışmamızda western blot yöntemiyle sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

- 1) Örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesi
- 2) Jele yüklenecek protein karışımının hazırlanması
- 3) Dikey jel elektroforezinin gerçekleştirilmesi
- 4) Jeldeki proteinlerin nitrosellüloz membrana transferi
- 5) Kromojenik immüneteksiyon kiti ile bantların görülmesi

Tablo 5: Western Blot çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi

Malzeme Listesi
1 Bullet Blender homogenizer (Next Advance, Inc, USA)
2 RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA)
3 0,5 mm zirconium oxide beads (Next Advance, Inc, USA)
4 Mikrosantrifüj (Eppendorf, Hamburg, Germany)
5 Qubit Flourometre (İnvitrogen, USA)
6 Qubit Protein Assay Kit (İnvitrogen, USA)
7 Qubit Assay Tüp 500µl (İnvitrogen, USA)
8 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA)
9 Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad Laboratories, USA)
10 XCell SureLock Mini-Cell Electroforepsis System (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)
11 NuPAGE MES SDS Buffer Kit (Bis-Tris jel için) (İnvitrogen, USA)
12 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris jel 15 kuyucuklu (İnvitrogen, USA)
13 SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (İnvitrogen, USA)
14 iBlot Transfer Stack Nitrocellulose, regular-size (İnvitrogen, USA)
15 iBlot Dry Blotting System (İnvitrogen, USA)
16 WesternBreeze Cromogenic Kit Anti-Rabbit (İnvitrogen, USA)
17 Anti-Adipose fatty acid binding protein antikoru (İnvitrogen, USA)

6.2.2.1 Qubit Fluorometre ile Protein Miktar Tayini

Hazırlanan doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda ve plazma örneklerinde protein ölçümleri Qubit protein kiti kullanılarak Qubit Fluorometer cihazında (İnvitrogen, USA) tespit edildi (127).

6.2.2.2 Ölçüm prosedürü

1. Ölçümde kullanılacak olan Qubit protein reagent 200 kat konsantre olduğu için öncelikle quant-it reagent Qubit protein buffer ile 1/200 oranında dilüe edildi. Örnekler ve üç tane standart için toplam 43 tane eppendorf numaralandırıldı. 40 tane örnek ve standartlar için 7 tane de hata payı hesaba katılarak $50 \times 199 = 9950 \mu\text{L}$ qubit protein buffer 15 mL'lik plastik santrifüj tüpüne yerleştirildi. Bunun üzerine standartlar, örnekler ve hata payı başına düşen 1 μL olacak şekilde qubit protein reagent eklendi ve 1/200 oranında dilüe edilmiş olan çalışma solüsyonu elde edilmiş oldu.
2. Kit içerisinde üç ayrı protein standart çözeltisi mevcuttu. 0,5 mL'lik üç ayrı eppendorf standart 1, standart 2, standart 3 olacak şekilde numaralandırıldı. Bu eppendorfların her birine yukarıda hazırlanan çalışma solüsyonunda 190 μL konuldu. Daha sonra sırasıyla protein standart 1, protein standart 2, protein standart 3 çözeltilerinden 10'ar μL alınıp standart 1, 2 ve 3 olarak numaralandırılmış eppendorfların içerisine konulup 2-3 saniye vorteks ile çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
3. Örneklerin konulacağı eppendorflar 1'den 40'a kadar numaralandırıldı. Bunların her birine 199 μL çalışma solüsyonunda ve

1µL' de örneklerden eklenip 2-3 saniye vorteks ile çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

4. Qubit Fluorometer cihazı açıldıktan sonra protein ölçüm metodu seçildi. İnkübasyon süresi tamamlanan standartlar sırasıyla standart 1, 2 ve 3 olacak şekilde cihazda okutulup kalibrasyon yapıldı.

Tablo 6: Kontrol ve MetS gruplarına ait karaciğer ve yağ dokusu örneklerindeki protein miktarları

Örnek numarası	Karaciğer dokusu (mg/mL)	Yağ dokusu (mg/mL)
Kontrol 1	4,78	3,07
Kontrol 2	4,48	5,1
Kontrol 3	5,2	3,52
Kontrol 4	4,07	5,2
Kontrol 5	4,90	3,63
Kontrol 6	4,81	3,17
Kontrol 7	4,60	5,0
MetS 1	3,86	-
MetS 2	2,76	3,10
MetS 3	3,05	3,48
MetS 4	2,94	1,04
MetS 5	4,81	0,667
MetS 6	4,43	0,355
Tedavi 1	4,32	1,71
Tedavi 2	3,82	3,95
Tedavi 3	3,66	3,71
Tedavi 4	3,81	3,63
Tedavi 5	5,0	3,54
Tedavi 6	3,59	0,89
Tedavi 7	4,07	0,904

5. Kalibrasyonun ardından sırasıyla örnekler okutulup çıkan sonuçlar dilüsyon faktörüyle çarpılacak ekrana gelip çarpıldıktan sonra kayıt altına alındı (Tablo 6).

Örneklerdeki protein miktarları ölçüm esnasında değerlendirilemediğinde 1/10 distile su ile dilüe edilip tekrardan çalışma solüsyonu ile aynı işlemlere tabi tutulup ölçüm yapıldı. Çıkan sonuçlar 10 ile çarpılıp tabloda yerlerine yazıldı.

6.2.2.3 Jele Yüklenecek Protein Örneklerinin Hazırlanması

Çalışma gruplarındaki protein miktarları kayıt altına alındıktan sonra jele yüklenecek örnek miktarları belirlendi. Çalışmada 15 kuyucuklu %4-12 Bis-Tris gradyan jeller kullanıldı. Her bir kuyucuğa 20 µL'lik karışım eklendi. Bu karışımın içine örnek, NuPAGE Sample Reducing Agent (10X), NuPAGE LDL Sample Buffer (4X) ve hesaplanan miktarda distile su eklendi. Western blot aşamasında kullanılan kitteki tespit yöntemi kromojenik deteksiyon yöntemi olduğu için en az 30 µg olmalıdır. Hazırlanan çalışmalar 200 µL'lik eppendorf tüplerine konuldu. 10 dakika 70°C'de denatüre edildikten sonra -20 °C'de 3-5 dk bekletildi.

6.2.2.4 Dikey Jel Elektroforez Sistemi Kullanımı

1. %4-12 Bis-Tris Jeli poşetinden çıkarıpüzerindeki tampon çözelti hafifçe sallayarak döküldü.
2. Jel kaseti üzerinde yer alan en alt kısımdaki beyaz bant sökülüp ve jel kuyucukları bozulmadan jel tarağı dikkatli bir şekilde çıkarılıp kuyucuklar içerisinde kalan sıvıyı boşaltmak için jel ters çevrilip kurutma kağıdı üzerinde silkelendi.

3. Jel kaseti dikey jel tankı içerisine yerleştirilip jel sıkıştırma aparatı takılarak jel kaseti sıkıştırıldı.
4. MES SDS Running Buffer (20X)'dan 25mL alınıp bir mesura konuldu. zerine de 475 mL distile su konuldu. Böylece 1XMES SDS Running Buffer elde edildi.
5. Dikey tankın jelin olduğu orta bölümüne hazırlanan 1XMES SDS Running Bufferdan döküldü. Dökülen bu buffer'ın kuyucukların üzerini 0,5 cm geçene kadar ilave edildi. Tankın orta bölümündeki bu tampon çözeltinin sızıp sızmadığı kontrol edilip daha sonra kalan buffer ilave edilir. Sadece jelin bulunduğu orta kısım olacak şekilde 500 μ L antioksidan konuldu.
6. Örnekler yüklenmeden önce 100 μ L 'lik bir pipet yardımıyla hazırlanan tampon çözelti aracılığıyla her bir kuyucuğa pipetaj yaparak temizleme işlemi gerçekleştirildi.
7. İlk ve son kuyucuğa SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standardından 5 μ L eklendi. Kalan kuyucuklara örneklerden 20 μ L ilave edildi.
8. Dikey jel elektroforezinin kapağı kutup başları yerine oturacak şekilde kapatıldı.
9. Güç kaynağı 165 V sabit akım olacak şekilde 55 dk ayarlanıp elektroforez başlatıldı.
10. Elektroforezdeki yürütme işlemi sonrasında güç kaynağı kapatıldı. Dikey jel elektroforez tankının kapağı kaldırıldı.

11. Jel sıkıştırma aparatı açılarak jel kaseti yerinden çıkartıldı.
12. Jel kaseti jel bıçağı kullanılarak kenarlarından bağlantı noktaları kırılarak hafifçe ayrıldı.
13. Jelin kuyucuk çıkıntıları ve jelin alt tarafında bulunan kalın jel birikintisinin olduğu yer jel bıçağı yardımıyla uzaklaştırıldı. içerisinde distile su bulunan temiz bir kap içerisinde jeli kasetten ayırma işlemi gerçekleştirildi.

6.2.2.5 İblot Dry Blotting System İle Blotlama İşlemi

1. Cihazın fişi takılıp arka tarafında buluna açma kapama düğmesi ile cihaz çalıştırılır.
2. iBlot Transfer Stack, nitrocelluloce kitinden bir adet anod, bir adet katod, bir adet sünger ve bir adet de kurutma kağıdı alındı.
3. Anod'un üzerindeki jeletin açılıp plastik kabıyla birlikte en alta konuldu.
4. Distile su içerisinde yer alan jel dikkatlice alınıp düzgün bir şekilde nitrocelluloz membran içeren anod tabakasının üzerine yerleştirildi.
5. Kit içerisinde yer alan filtre kağıdı distile su ile ıslatıldı ve ıslatılan filtre kağıdı jel üzerin dikkatli bir şekilde yerleştirilip roller kullanılarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
6. Katot'un üzerindeki jelatin açılıp plastiğinden uzaklaştırılır ve bakır yüzey yukarı, jelimsi yüzey ıslak filtre kağıdına bakacak şekilde filtre

kağıdının üzerine dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Roller kullanılarak hava kabarcıkları tekrar uzaklaştırıldı.

7. Son olarak sünger üzerindeki metal kısım cihazın kapak kısmında yer alan elektroda denk gelecek şekilde yerleştirilip kapak sıkıca kapatıldı.
8. Program düğmesinden P3 seçilip 8 dakikaya ayarlanıp cihaz üzerindeki start/stop düğmesine basılarak transfer işlemi gerçekleştirildi. Ayarlanan sürenin sonunda cihazın alarm sesi duyuldu, tekrar start/stop düğmesine basılarak cihaz durduruldu. Cihazın kapağı açılarak sünger, katot tabakası, kurutma kağıdı ve jel ortamdan uzaklaştırıldı.
9. Anod tabakasının üzerinde yer alan nitrosellüloz membran steril bir bistüri yardımıyla alındı.

6.2.2.6 Kromojenik Western Blot İmmüneteksiyon Kit Prosedürü

1. Transferi gerçekleştirilen membran steril distile su içerisine alınarak SDS kalıntıları uzaklaştırıldı. Bloklama solüsyonu, antikor yıkama solüsyonu ve antikor sulandırma solüsyonunun hazırlanışı tablo verildi.

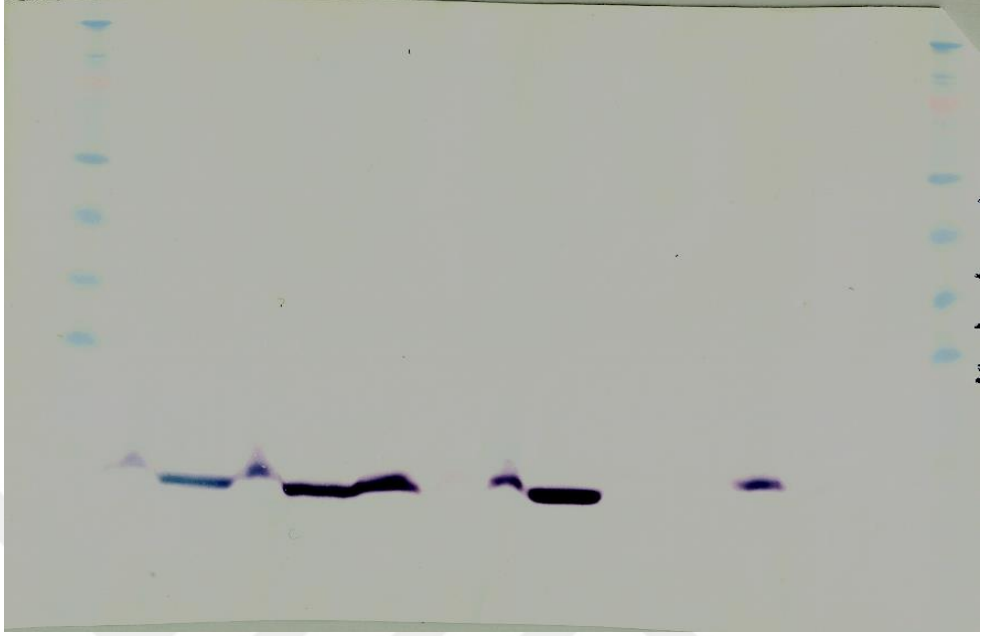
Tablo 7: Western blot çalışması için solüsyonların hazırlanışı

Solüsyon	Nitrosellüloz membran için	
	Ultra filtre edilmiş su	14ml
Bloklama solüsyonu	Blocker/Diluent A	4 ml
	Blocker/Diluent B	2 ml
	Total Volume	20 ml
Primer Antikor	10 mL bloklama solüsyonunun	
Dilüenti	içerisinde primer antikor 1/1000 oranında dilüe edildi.	
Antikor Yıkama Solüsyonu	Ultra filtre edilmiş su Antikor	150 mL
	Yıkama solüsyonu (16X)	10 mL
	Total Volume	160 mL

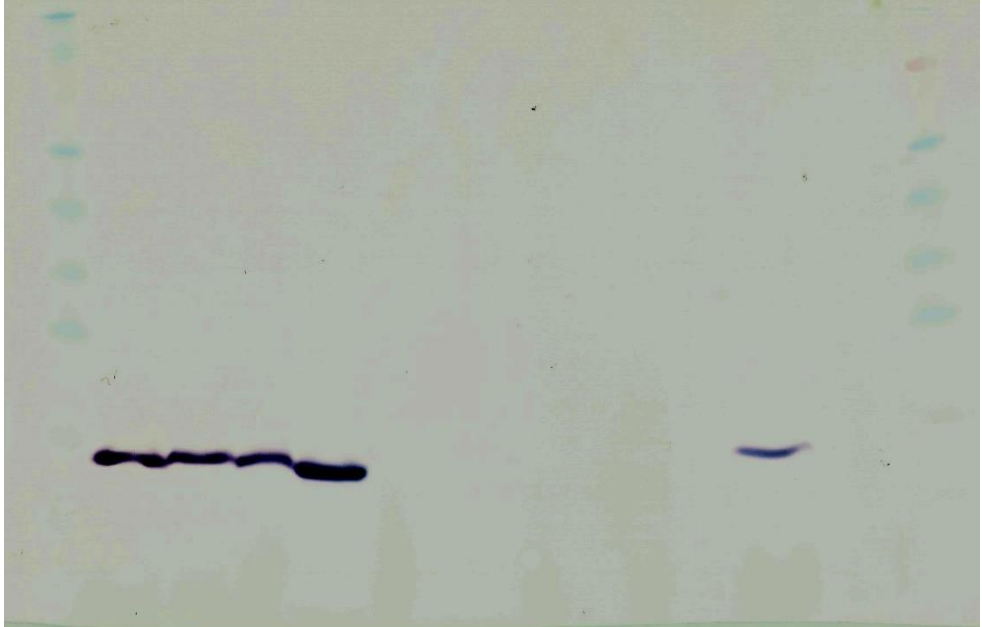
- Kit ile birlikte verilen plastik kutucukların içerisine membran yerleştirildikten sonra yukarıda hazırlanan bloklama solüsyonunun 10 mL membranın üzerine döküldü. 30 dakika oda sıcaklığında shakerda sallama işlemi gerçekleştirildi.
- Membran üzerindeki bloklama solüsyonu döküldükten sonra üzerine 20 mL distile su ilave edilip shakerda 5 dakika yıkandı. Bu işlem iki kez yapıldı.
- Primer antikor (Anti-Adipose fatty acid binding protein) bloking solüsyonunun içerisinde 1/1000 oranında dilüe edildikten sonra bu primer antikor membran üzerine dökülüp oda ısısında 1 saat inkübe edildi.

5. Primer antikor solüsyonu döküldükten sonra 20 mL antikor yıkama solüsyonu ilave edilip shakerda 5 dakika yıkandı ve bu işlem dört kez tekrarlandı. Her defasında primer antikor dökülüp yenisi ile değiştirildi.
6. Membran shakerda 10 mL sekonder antikor ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve daha sonra sekonder antikor döküldü.
7. 20 mL antikor yıkama solüsyonu ile shakerda yıkama işlemi 5 dakika yapıldı ve bu işlem 4 kez tekrarlandı.
8. 2 dakika 20 mL distile su ile membran temizlendi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı.
9. 5 mL kromojenik substrat ilave edilip inkübasyona bırakıldı. 10-15 dakika içerisinde pembe renkli bantlar görülmeye başlanınca 20 mL distile su ile 2 dakika boyunca shakerda yıkama yapıldı. Her seferinde membranda ki su dökülüp yenisi ile değiştirildi ve işlem 3 kez tekrarlandı.
10. Daha sonra membran kurutma kağıdının üzerinde kurumaya bırakıldı.

Karaciğer ve yağ dokusundaki AFABP ekspresyonu Western Blot yöntemi ile tespit edilip değerlendirildi.



Şekil 15. MetS ve kontrol grubundaki yağ dokusunda AFABP'nin western blotlama yöntemiyle gösterilmesi



Şekil 16. Tedavi grubundaki yağ ve karaciğer dokusundaki AFABP'nin western blotlama yöntemiyle gösterilmesi

7. TARTIŞMA

İnsülin direnciyle başlayan MetS; ülkemizde ve dünyada giderek artan ve çok sayıda insanı etkileyen önemli mortalite ve morbidite nedeni olduğu ve temelinde ise; fiziksel inaktivite, beslenme alışkanlıkları, yaşlanma, abdominal obezite, CHO içeriği yüksek diyetlerin tüketimi ve genetik faktörler olduğu görülmektedir (128).

Sendromun tedavisi hastalığa etken olan bu bileşenlerin ortadan kaldırılmasına yönelik olmalıdır. İnsülin direncine neden olan risk faktörlerinin yaşam şekli değişiklikleri ile kontrol altına alınması ve gerekli koşullarda ilaç tedavisinin uygulanmasıdır. En uygun tedavi yöntemi, düzenli egzersiz ile kilo kaybı ve sağlıklı beslenmedir.

MetS'un prevalansındaki artışlar sebebiyle bilim insanları bu konuda daha fazla araştırma yapmaya gereksinim duymuşlar. Bu çalışmalarda fruktoz metabolizmasının obezite, insülin direnci, inflamasyon, HT ve karaciğer yağlanması üzerine etkisinin olduğunu ve bu nedenle MetS geliştirme riskini de arttırdığını düşünüldüğü için önemli bileşenlerin geliştiği deneysel modellere gereksinim duyulmuş ve bu amaçla 3 farklı model kullanılmıştır (129). Birinci modelde genetik olarak obez fare ve sıçanlar (Zucker diabetic fatty rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, db/db mice, ob/ob mice, 11 β -HSD-1 overeksprese rats, vs.) kullanılmıştır (129-132). İkinci modelde ise; alloksan ve streptozotosin gibi kimyasal maddeler kullanılarak MetS oluşturulmak istenmiş, fakat bu modelde MetS'un bileşeni olan obezite ve hipertansiyon bulguları gözlenmemiştir. MetS oluşturmak için en yaygın kullanılan yöntem ise deney hayvanlarını fruktozca zengin bir diyetle beslemektir. Bazı çalışmalar da fruktoz

yeme karıştırılarak verilirken, bazı çalışmalar da ise fruktoz; içme suyuna karıştırılarak verilmiştir (133-136). Çalışmalarda fruktoz kaynağı olarak sukroz, yüksek fruktoz içeren mısır şurubu ve kristal halde fruktoz kullanılmaktadır (137,138). Çalışmamızda fuktoz içme suyuna karıştırılarak verilmiştir.

Fruktoz karaciğerde metabolize edilirken kontrol basamağı olan fosfofruktokinaz Karaciğerde Fruktozdan fruktoz-1-fosfat oluşurken fosfofruktokinaz basamağı pas geçmesi ve kontrol edilemediği aşırı fruktoz tüketimi serbest yağ asitleri düzeyinde bir artışa ve obeziteye yol açar ve direkt olarak hepatik lipid metabolizmasına etki eder. Bu durum, hepatik VLDL-kolesterol ve trigliserit sentezinin artmasına ve sonuçta da aterojenik lipid profilinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yüksek dozda fruktoz alımı ile SYA'lerinin artması sonucu hepatik yağ oksidasyonu artar ve bu yağ asitlerinin karaciğerde birikmesi hem oksidatif strese hem de pro-inflamataur sitokinlerin transkripsiyonlarını arttırarak inflamasyona neden olmaktadır. (139-141). Ayrıca fruktozun metabolizması nedeniyle tokluk sinyallerini oluşturmamasına ve daha çok tüketilmesine ve dolayısıyla obeziteye neden olmaktadır. Fruktoz bu özelliğiyle vücuttaki birçok metabolik aktiviteyi etkilemekte ve kronik hastalıklar için gizli bir tehdit oluşturmaktadır (142).

%10'luk Fruktoz uygulaması yapılan bir çalışma da MetS'lu ratların kontrol grubuna göre vücut ağırlığının ve kan glukozunun önemli derecede ($p<0,001$) arttığı gözlenmiş, ayrıca Nigella Sativa ya da Garlic'in tek başına ya da birlikte 8 hafta verilmesi; vücut ağırlığı ve kan glukozun da önemli derecede azalma olduğu gözlemlenmiştir. %20'lik Fruktoz uygulaması yapılan bir çalışmada ise; Deneyin başlangıcında ve sonunda ölçülen ağırlık artışları

değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre MetS grubunda artış olduğu tespit edilmiş ancak bu artışta anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (143). Çalışmamızda kullandığımız fruktoz diyetiyle oluşturulan MetS modeline benzer şekilde %20'lik fruktoz diyetiyle yapılan deney sonrası sıçanlarda, sonuçlarımızı destekleyecek şekilde uyumluluk göstermiştir.

Çalışmamızda ağırlık artışlarına baktığımızda; kontrol grubu ve MetS oluşturulan grupta başlangıç ve son ağırlık arasında anlamlı ağırlık artışı olmadığı gözlemlenmiştir. TT uygulanan tedavi grubunda da başlangıç ve son ağırlık arasında anlamlı ağırlık azalması gözlemlenmemiştir. Fruktozun etkilerinden dolayı ağırlık artışının olduğu söylenebilir.

Metabolik Sendrom oluşumu ve gelişim sürecinde kan glukoz düzeylerindeki değişiklikler ve insülin direnci önemli yer almaktadır. Grigorova ve arkadaşlarının W. Plymouth Rock-mini erkeklerle yaptıkları çalışmada Tribulus terrestris bitkisi verilen grupta serum glukoz düzeyinin kontrol grubuna göre önemli derecede düştüğünü ifade etmişlerdir (144,145). Ancak bizim çalışmamızda TT ekstraktının uygulandığı 3.grupdaki ($108,74 \pm 9,36$ mg/dl) glukoz düzeylerinde; MS oluşturulan 2.gruba kıyasla düşüş görülmesine rağmen istatistiksel anlamda ($p > 0,05$) bir farklılık gözlenmediği için bu çalışma bizim sonuçlarımızı destekleyecek şekilde uyumlu değildir. Çalışmamızda kontrol grubunda deneysel uygulamalar sonucunda oluşan açlık kan glukozu düzeyleri $99,00 \pm 10,7$ mg/dl iken göre, MetS oluşturulan grubun açlık kan glukozu düzeyleri $124,30 \pm 12,68$ mg/dl olduğu anlamlı artış gözlemlendi ($p < 0,01$). MS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artan açlık kan glukozu düzeylerinde ki artışın sebebinin enerji fazlalığı olabilir.

Fruktoz gibi gıdalarla beslenme aşırı miktarda yağ asidi oluşmasına neden olmakta ve insüline duyarlı dokularda substrat fazlalığı olduğu için insülin direncine neden olmaktadır. Fruktoz ile beslenme; Esterlenmemiş yağ asitlerinin dolaşımında hem yeniden esterleşmesini hem de yağ asidinin novo sentezini uyarak lipogenezi ve hepatik trigliserid üretimini sağlamaktadır (146).

MetS'un gelişmesinde insülin direnci önemli yer aldığı için insülin hormon düzeylerinde ki değişimleri gözlenmiştir. Tripathy ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada insülin direncinin hesaplanan HOMA-IR testi ile değeri belirlenmiştir. Normal glukoz toleransı olanlar ile bozulmuş glukoz toleransı olan durumlar kıyaslanmış olup ve bozulmuş glukoz toleransının olduğu durumlarda insülin direncinin anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür (147). Haffner ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada insülin direnci olan kişilerde aterosjenik risk faktörünün fazla olduğu gözlemlenmiş ve insülin direncinin diyabete bağlı kardiyovasküler hastalığın patogenezinde temel faktör olduğu belirlenmiştir (148). Chan ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma da 562 yeni tanı almış tip 2 diyabetik hastayla yaptığı bir çalışmada HbA1c düzeylerinin HOMA-IR ile değerlendirilen insülin direnci ölçümleri ile pozitif korelasyon ($p<0,001$) görülmüştür (149).

Çalışmamızda HOMA-IR düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna ($1,96\pm0,12$ mg/dl) kıyasla 2. gruptaki ($3,12\pm0,30$ mg/dl) artış istatistiki açıdan anlamlıdır ($p<0,01$). MS grubuna (grup 2) kıyasla TT ekstraktı uygulanan grup 3'de ($2,34\pm0,28$ mg/dl) de istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0,01$). Kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artışın gözlemlendiği tedavi grubu olan TT grubuyla istatistiksel olarak düşüş göstermiştir ($p<0,05$). Düşük HOMA-IR insülin

direncinin geliştiğini göstermektedir. HOMA-IR düzeylerinin TT ekstraktının uygulanması sonucu azalması plazmada ki serbest yağ asitlerini baskılayan bir mekanizma ile insülin düzeylerini de azalttığı ifade edilebilir.

Le ve ark. sağlıklı genç erkekler üzerinde yapmış oldukları 1 haftalık fruktoz diyetinin karaciğer de lipit birikimini artırdığını gözlemlemişler ve bu dokulardaki lipit birikimi sonucu insülin direncinin geliştiğini dolayısıyla lipolizde bozulmalara neden olduğunu gözlemlemişlerdir (150). Akar ve ark. diyabetli tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 8 hafta resveratrol uygulamasının kontrol ve diyabet oluşturulan gruplara göre insülin seviyesi önemli derece de artmıştır ancak artışın sebebi tam olarak açıklanmamaktadır (151).

Çalışmamızda insülin düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna ($8,10 \pm 0,65$ mIU/L) göre, MS oluşturulan 2.grupta ($10,18 \pm 0,55$ mIU/L) anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0,01$) 3.grupta anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi. TT ekstraktı verdiğimiz grup 3'daki ($8,71 \pm 0,56$ mIU/L) insülin düzeyleri MS oluşturulan 2.gruba kıyasla anlamlı bir azalış gözlemlendi ($p < 0,01$). İnsülin direncine bağlı olarak plazmada ki serbest yağ asitleri artarak trigliserid üretimi de artırmaktadır. İnsülin direnci lipoprotein lipazın aktivitesinde artışa yol açarak serbest yağ asidi salınmasını arttırmaktadır.

Metabolik sendromun gelişmesinde insülin direnci ve abdominal obezite önemli bir yer tutmaktadır. İnsülin direnci ve lipid profili ile ilgili yapılan çalışmalarda yüksek LDL-kolesterol, düşük HDL-kolesterol ve yüksek trigliserid düzeyleri ile insülin direnci arasında ilişki bulunmuştur. İnsülin direnci; plazma serbest yağ asitlerinde ve trigliseridde artışa, karaciğerde trigliserid birikimine ve

lipoprotein lipaz aktivitesinde artma sonucu HDL-kolesterol yıkımında hızlanmaya yol açar (152).

Resveratrol'ün koruyucu etkisi üzerine yapılan bir çalışmada; HOMA indeksi, insülin, trigliserid ve kolesterol değerlerinin kontrol seviyelerine yakın değerlere inmesi, yüksek fruktoz alan sıçanlarda fruktoz alımına bağlı olarak gelişen insülin direnci, hiperinsülinemi ve hiperlipidemi üzerine olumlu etki olduğu saptanmıştır. Resveratrol beta hücrelerinden insülin salgılanmasının artması nedeniyle insülin duyarlılığının iyileştirilmesinden sorumludur (153,154).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda insülin direnci gelişimi ve barsak lipoprotein metabolizmasının deregülasyonu arasında ilişki saptanmıştır. Fruktoz ile besleme hem lipid sentezini hem de mikrozomal trigliserid transfer proteini kütlesi (MTP) ve aktivitesini artırarak B48 – içeren lipoprotein partikülleri formunda apolipoprotein salgılanmasını uyarır ve bu durum, insülin dirençli veya diyabetik hayvanlarda açlık lipoproteinlerinin salgılanmasından sorumlu bir mekanizma olabileceğini göstermektedir (155,156). MS'lu grupta lipid parametrelerinde gözlenen bu durumun, deneysel olarak MS oluşturmak için deneklere verilen fruktozdan ve bu nedenle buna bağlı olarak gelişen metabolik sendromdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü Fruktoz metabolizması karaciğerde gerçekleşmektedir. Fruktoz burada fosfofruktokinaz enzimi tarafından fosforilasyona uğratarak fruktoz-1-fosfata, daha sonra aldolaz enzimlerinin etkisi ile triozlara dönüşmekte ve oluşan triozlarda yağ asitlerine dönüştürülmektedir. Fruktozun yağ asidi reesterifikasyonu ile VLDL-trigliserit sentezini destekleyerek hepatik lipid oksidasyonunu inhibe eder. VLDL metabolizması sırasında LDL partikülleri oluşurken HDL ise kullanılmaktadır.

Grigorova ve arkadaşlarının W. Plymouth Rock-mini erkeklerle yaptıkları çalışmada Tribulus terrestris bitkisi verilen grupta kontrol grubuna göre toplam kolesterol miktarının % 9,24 oranında düştüğünü ($p<0,05$) ve bu bitkinin etkisinin 8 hafta boyunca devam ettiğini söylemişlerdir (144).

Yapılan bir meta analiz çalışmasında Kanadalı bir grup; Sağlıklı, bozulmuş açlık glukozu olan, tip 2 diyabetli, koroner kalp hastalığı açısından yüksek risk altında bulunan ve herhangi bir türde hiperlipidemisi olan bireyler çalışmaya dahil edilerek; diyabetli bireylerde fruktozun izokalorik olarak farklı karbonhidrat türleriyle yer değiştirmesinin trigliserit düzeyleri üzerine etkisini görmek için 725 araştırma içerisinde kriterlere uygun olan 14 çalışmayı belirleyerek bu çalışma üzerinde analiz edilmişlerdir. Fruktozun izokalorik olarak diğer karbonhidrat türleriyle yer değiştirmesi TG düzeyleri üzerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiş ancak; Tip 1 diyabetlileri, tip 2 diyabetli bireylerden ayırarak yapılan daha ileri bir analizde, fruktozun sadece tip 2 diyabetli bireylerde TG düzeylerini arttırdığı görülmüştür. Bu etki kısa dönemde (≤ 4 hafta) yüksek dozda fruktoz alındığında (>65 g/gün) ve fruktozun yerine nişasta geçtiğinde daha da belirginleşmesine rağmen (157,158) Fruktoz tüketimi yerine sakkaroz kullanıldığında böyle bir etki gözlenmemiştir (159-161). Elde edilen bu çalışmalara göre; diyabetli bireylerde orta düzeyde fruktoz alımının (<50 g/gün ya da metabolize edilebilen enerji alımının %10'u) kabul edilebilir olabileceği düşünülmüştür (162-164). Çalışmamızda; yüksek fruktozu sularına eklediğimiz sıçanlarda kolesterol ve açlık trigliserid değerlerinde artış yani dislipidemi oluşumu, sıçan ve diğer kemirgenler üzerinde yapılan daha önceki çalışmalar ile paralel olduğu gözlenmiştir.

Nar Bitkisinin (*Punica granatum*) sulu ekstresinin uygulandığı bir çalışmada; oral yoldan 21 gün boyunca 250 mg/kg ve 500 mg/ kg dozda uygulanması sonucu kontrol gruplarıyla diyabetik gruplar kıyaslandığında, total kolesterolün, kan glukozunun, trigliserit ve LDL kolesterolü hızlı bir şekilde düşürdüğü; HDL kolesterolünün, doku lipid peroksidasyonunun ve antioksidan enzimlerinin arttırdığı saptanmıştır (165). Khan ve arkadaşlarının tarçın kullanarak yaptıkları çalışmaya göre; tarçının açlık kan glikozu, LDL kolesterolü ve trigliserid değerlerini önemli ölçüde azaltmasına rağmen HDL kolesterol seviyesinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı gözlenmiştir (166). Jayagopal ve arkadaşlarının *Glycine max* (soya fasülyesi) üzerinde yaptığı çalışmada bitkinin insülin direncini artırdığı, total kolesterol ve LDL kolesterolü düşürdüğü, serbest tiroksin düzeyini artırdığı sonucuna varılmış ancak HDL kolesterol ve trigliserit üzerinde bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (167).

Bocarsly ve ark. yaptıkları bir çalışmada, farelere belli sürelerde Yüksek Fruktöz Meyve Şrubu (YFMS) ve sakaroz verilip farelerin vücut ağırlığı, yağ ve trigliserit üzerine olan etkisi araştırılmış ve elde edilen verilere göre; zengin YFMS ile beslenen farelerin ağırlığında, trigliserit seviyelerinde anormal artış ve yağ birikimi saptanmıştır. Bu yüzden YFMS'nin aşırı derecede tüketilmesi obesitenin temel faktör olabileceği vurgulanmıştır (168).

Rocha ve ark. Resveratrol'un koruyucu etkisi üzerine yapılan bir çalışmada; yüksek yağlı diyet uygulanan sıçanlarda içme suyu yoluyla verilen 1 mg/kg resveratrol tedavisinin total, LDL ve VLDL kolesterol konsantrasyonlarını önemli derecede azalttığı saptanmıştır (169). Yuan ve ark. Fareler üzerinde yaptıkları çalışmada; Ginseng yaprak ekstraktı kullanılması sonucu yüksek yağlı

diyetle beslenmeye bağı olarak artan serum trigliserid ve total kolesterolün önemli derecede azaldığını gözlemlemişlerdir (170). Li ve arkadaşlarının (171) sağlıklı kobay farelerini kullanarak yaptıkları çalışmada tribulus terrestris ekstraktının glikometabolizmi etkilediği, glukoneojenezisi belirgin şekilde düşürdüğü, total Kolesterol düzeylerini ve trigliserid seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da TT uygulandıktan sonra total kolesterol, trigliserit ve LDL düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüşe geçmiş HDL düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır.

Çalışmamızda özellikle lipid profilleri olarak TK, TG, LDL-K değerleri açısından MS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,01$) artış gözlenirken, HDL-K düzeylerinde ise anlamlı ($p<0,01$) düzeyde düşüş olduğu gözlemlendi. TT kullanılan grup ile karşılaştırıldığında TK,TG,LDL-K düzeylerinde anlamlı azalma meydana geldiği HDL-K düzeylerinde ise anlamlı artış gözlenmiştir. Grup 2 ve Grup 3'te ki TK ve TG düzeylerinde istatistiksel farklılık olmamıştır ($p>0,05$). Grup 3 ve kontrol grubu arasında ise HDL düzeylerinde istatistiksel farklılık olmamıştır ($p>0,05$). MetS oluşumu sonucu LDL kolestrol düzeyindeki artışın TT ekstraktının tedavisiyle kontrole yakın bir değere döndüğü görülmüştür.

Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda, fruktozun adipoz doku gibi metabolik dokularda da önemli etkisi olmuştur. MS üzerine yapılan çalışmalardan biri de adiponektin düzeyinin düşmesi ile ateroskleroz sürecinin hızlanmasıdır (172). Çeşitli çalışmalarda, Ox-LDL'nin aterosklerozda proinflamatuvar olayların başlama ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (173).

Holvoet ve ark. ile Sigurdardottir ve ark. yaptıkları çalışmalarda, MS'lu hastaların ox-LDL düzeylerinin MS olmayan gruba göre daha yüksek olduğunu ve oksidan stresin arttığını belirtmişler (110,174). Bizim çalışmamızda MS grubunda ($3,98 \pm 0,44$ ug/ml) ox-LDL düzeyinin kontrol grubuna ($2,71 \pm 0,44$ ug/ml) göre anlamlı bir artış saptandı. Ox-LDL düzeylerinin yüksek olmasının sebebinin; Antioksidan kapasitesinin düşük olması ile bağlantılı olabileceğini düşünebiliriz. Lipid oksidasyonu arttığı için antioksidan kapasitesi zayıflamıştır.

Resveratrolün LDL oksidasyonunu üzerinde ki olumlu etkisi ilk kez Frankel ve ark. tarafından kanıtlanmış olup, resveratrolün Cu^{++} gibi metal iyonlarıyla inkübasyon sonucu indüklenmiş insan LDL'lerinin oksidasyonunu azalttığı saptanmıştır. Resveratrol; askorbik asit ve α - tokoferol gibi antioksidanlardan çok daha güçlü bir şekilde LDL oksidasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (175). Çalışmamızda da TT'in koruyucu etkisi anlamlı bir şekilde görülmüştür.

AFABP son zamanlarda MS'un biomarker olarak tanımlanmıştır. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar; AFABP'nin inflamasyon, lipid metabolizması ve insülin direncinin merkezi olabileceğini göstermiştir (176). Serum AFABP seviyeleri bozulmuş glukoz metabolizması ile yakından ilişkili olup Tip-2 DM 'un gelişmesinin göstergesi olarak kullanılabilir (177). AFABP ve CRP'nin ilişkisinin sıklıkla obezite ile ilişkisi olduğu açıklanmıştır. Bazı çalışmalar da CPR ve AFABP ana faktörün obezite olabileceğini (178,179) ancak bazı çalışmalar da da aradaki bağlantının obezite den bağımsız olduğunu ifade etmişlerdir (180).

Xu ve ark. , larının yaptıkları çalışmada A-FABP gen defekti olan farelerin hem genetik hem de obezitenin olduğu durumlarda insülin direnci, dislipidemi,

hiperglisemi ve yağlı karaciğer hastalığının gelişmesini önlediklerini saptamışlar (181).

İnvitro çalışmalarda AFABP ekspresyonunun; yağ asitlerinde, PPAR-g, TZD ve insülin direnci üzerinde olumlu düzenlemelerinin olduğu görülmektedir, bu çalışmalar obez ratlar üzerinde de kanıtlanmıştır (182-186).

İnsülin direnci, aynı zamanda proinflamatuvar olduğu için Hiperinsülinemi IL-6, TNF- α , ve CRP gibi inflamatuvar faktörlerin salınımının artmasına sebep olur (187,188). Obezlerde IL-6 düzeylerinin artmış olmasını açıklayan mekanizma; yağ dokusunun IL-6 üretilip, salgılayabilmesidir (189-191). IL-6, obez olguların yağ hücrelerinden yüksek oranda salgılanmakta ve insülin metabolizmasını düzenlemede önemli bir hormonal role sahiptir. Anti-inflamatuvar özellik gösterir. Yapılan bir çalışmada insan yağ dokusundan salgılanan IL-6 düzeylerinin insülin direnci ile anlamlı bir ilişki olduğu saptanırken, obezite ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır (192).

Çalışmamızda; Serum IL-6 düzeyleri kontrol grubuna ($417,99 \pm 30,54$ ng/L) göre, MS oluşturulan 2.grupta ($605,59 \pm 30,29$ ng/L) ve TT ekstraktı verdiğimiz 3. Grupta ($585,78 \pm 36,23$ ng/L) anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,01$). MS oluşturulan 2. Grup ($605,59 \pm 30,29$ ng/L), TT ekstraktı verdiğimiz grup 3 ($585,78 \pm 36,23$ ng/L) 'a göre anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür ($p > 0,05$) TT'in koruyucu etkisi vardır ancak anlamlı düşüş gözlenmemiştir.

Obezite ile birlikte artan TNF- α konsantrasyonu insülin-reseptör fonksiyonunu bozarak ve GLUT mRNA sentezini inhibe ederek insülin direncine yol açar. TNF, hücre ölümü ile adiposit yıkımını kolaylaştırıp lipogenesizi inhibe eder ve lipolizi artırıp obesite üzerinde koruyucu etki göstermektedir. Son yapılan

araştırmalara göre, glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olan sitokin TNF- α 'dır. TNF- α apoptotik etkili olup insülin reseptör sayısını azaltarak insülin direnci oluşturur ve insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesini bozarak hücrelerin glikoz alımını azaltmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda; TNF- α 'nın etkisinin bloke edilmesi ile obezitenin gelişmesi azalmış, insülin düzeyleri ise düşmüştür (193,194). Yi ve ark yüksek oranda yağ içeren diyetle beslenen tavşanlarda serum total kolesterol ve trigliserid düzeylerinde belirlenen artışlarla beraber serum TNF- α düzeylerinde de önemli artışlar olduğunu saptamışlar. Panax notoginseng saponinleri uygulaması ile de TK, TG ve TNF- α parametreleri üzerinde önemli bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiş ve bu düşüşün sebebinin ise postheparin LPL aktivitesindeki artışa bağlı olduğu belirlenmiştir (195). Çalışmamızda da Serum TNF- α düzeyleri kontrol grubuna (464,29 $\pm$ 30,54 ng/L) göre, MetS oluşturulan 2.grupta (587,58 $\pm$ 49,24 ng/L) anlamlı (p<0,01) bir artış gözlenirken, MetS oluşturulan 2.Grup (587,58 $\pm$ 49,24 ng/L)'da TT ekstraktı verdiğimiz grup3 (550,26 $\pm$ 30,16 ng/L)'e göre anlamlı olmayan bir azalma göstermiştir (p>0,05). Elde edilen bu sonuç bize kullandığımız bitkinin MetS oluştuktan sonra koruyucu etki göstermediğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; fruktoz verilerek MetS oluşturduğumuz ratlarda Tribulus terrestris ekstraktı uygulanması ile; lipid profilinde ve serum düzeylerinde göze çarpan bir düzelme gözledik. Tribulus terrestris ekstraktının kullanımı; MetS ve benzeri hastalıkların gelişimini önlemede ve tedavisinde umut verici bir seçenek olarak görünmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Balkau B, Valensi P, Eschwege E, Slama G. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab J* 2007; 33: 405–13.
2. Alberti G. Introduction to the metabolic syndrome. *Euro Heart J Suppl* 2005; 7: 3–5.
3. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-607.
4. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Metabolik Sendrom Kılavuzu. Tarihi: 02 Ekim 2009.
5. Metabolik Sendrom Araştırma Grubu. METSAR sonuçları. XX. Ulusal Kardiyoloji Kongresi. Antalya, 2004.
6. Earl S, Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the international diabetes federation among adults in the US. *Diabetes Care* 2005; 28: 2745-9.
7. Onat A, Karabulut A, Yazıcı M, Can G, Sansoy V. Türk yetişkinlerde hiperkolesterolemi ve hipertansiyon birlikteliği: Sıklığına ve kardiyovasküler riski öngördürmesine ilişkin TEKHARF çalışması verileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi* 2004; 32: 533-41.
8. Oğuz A, Altuntaş Y, Karsidağ K, ve ark. The prevalence of metabolic syndrome in Turkey. *Obesity Reviews* 2010; 11: 486.
9. Roche HM, Phillips C, Gibney MJ. The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 371-7.
10. Chan N Norman, Kong PS Alice, Chan CN Juliana. Metabolic Syndrome and Type2 Diabetes: The Hong Kong Perspective. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26 (3): 51-57.
11. Stanhope KL. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med* 2012; 63: 329–43.
12. Ozbakkaloglu M, Demirci C. Yüzyılın Salgını: Metabolik Sendrom. *SSK Tepecik Hastanesi Dergisi* 2003; 13: 121–127.
13. Ford, ES A. comparison of the prevalance of the metabolic syndrome using two proposed definitions, *Diabetes Care* 2003; 26: 575-81.
14. Grundy, SM, Brewer, HB, ve ark. Definition of Metabolic Syndrome, Definition of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition, *Circulation* 2004; 109, 433-438.
15. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312.
16. Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, Obesity and Insulin Resistance-The emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med* 2001; 345: 1345-1346.
17. Işıldak M, Güven GS, Gürlek A. Metabolik sendrom ve insülin direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 96-99.
18. Roith LR, Zick Y: Recent Advances in Our Understanding of Insulin Action and Insulin Resistance. *Diabetes Care* 2001; 24: 588-597.

19. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001; 24: 588 - 97.
20. Cusi K, Maezono K, Osman A, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105: 311 - 20.
21. Miranda PJ, De Fronzo RA, Califf RM, Guyton JR: Metabolic Syndrome: Definition, Pathophysiology, and Mechanism. *Am Heart J* 2005; 149, 33-45.
22. Stears AJ, Byrne CD: Adipocyte Metabolism and The Metabolic Syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2001; 3: 129-142.
23. Watkins PJ *ABC of Diabetes*, fifth edition, GBR: BMJ Publishing Group, London 2003; 1-6.
24. Yılmaz B *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi*, Feryal Matbaacılık, Tuğra Ajans, Ankara, 1. Basım 1999; 53-59.
25. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggi ani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 57-63.
26. Altuntaş Y. İnsülin direnci ve ölçüm metodları. Ed. Yenigün M. Her yönüyle diabetes mellitus. 2. Basım, İstanbul: Nobel tıp kitapevi 2001: 839-852. 56.
27. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current. *Arch Intern Med* 2002; 14: 2074- 9. 2.
28. National Institutes of Health. Clinical Guidelines On The Identification, Evaluation And Treatment of Overweight and Obesity in Adults. NIH Publication 1998; 98- 4083.
29. Gregg EW, Cheng YJ, Cadwell BL, Imperatore G, Williams DE, Flegal KM, et al. Secular trends in cardiovascular disease risk factors according to body mass index in US adults. *JAMA* 2005; 20: 1868- 74. 4.
30. Brown CD, Higgins M, Donato KA, et al. Body mass index and prevalence of risk factors for cardiovascular disease. *Obes Res* 2000; 8: 605- 19.
31. Bleckburn, GL, Bevis, LC www.medscape.com. The Obesity Epidemic: Prevention and Treatment of the Metabolic Syndrome, September, 2004.
32. Grundy, SM, Hansen, et al. Clinic Management of the Metabolic Syndrome, Report of the American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute/American Diabetes Association Conference on Scientific Issues Related to Management, *Circulation*, 2004; 109: 551-556.
33. Grundy, SM. What is the Contribution of Obesity to the Metabolic Syndrome? *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am* 2004; 33: 267-282.
34. Carr, DB, Utzschneider, et al. Intra-Abdominal Fat is a Major Determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Criteria for the Metabolic Syndrome, *Diabetes* 2004; 53: 2087-2094.
35. Reilly, MP, Rader, DJ. The Metabolic Syndrome: More than the sum of its parts? *Circulation* 2003; 108: 1546-1551.

36. Kahn, BB, Flier, SJ. Obesity and Insulin Resistance, J. Clin. Invest 2000; 106(4): 473-481.
37. Steppan CM, Bailey ST: Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM et al The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 2001; 409: 307-312.
38. Macda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y & Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipase specific collagen-like factor, apMI (adipose most abundant gene transcript 1).Biochemical and Biophysical Research Communications 1996; 221: 286- 289.
39. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T &Tomita ~ Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma.Journal of Biochemistry 1996; 120: 803-812.
40. Abate, N. Obesity and Cardiovascular Disease, Pathogenetic Role of the Metabolic Syndrome and Therapeutic Implications, Journal of Diabetes and Its Complications 2000; 14: 154-174.
41. Morales PA, Mitchell BD, Valdez RA, et al. Incidence of NIDDM and impaired glucose tolerance in hypertensive subjects. The San Antonio Heart Study. Diabetes 1993; 42: 154- 61.
42. Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, et al. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Hypertension 1997; 30: 1144 -9.
43. Haffner SM. Epidemiology of hypertension and insulin resistance syndrome. J Hypertens Suppl 1997; 15: S25-S30.
44. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidemias. The task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Atherosclerosis. 2011; 217S: S1-44.
45. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2013; 39 (3):205-209.
46. Görpe U. Polimetabolik sendrom. In Yenigün M, Altuntaş Y(eds), Her Yönüyle Diabetes Mellitus, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2001: 853-856.
47. LM Tierney, SJ McPhee, MA Papadakis. Current medical Diagnosis & Treatment. International edition. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill 2002; 1203–1215. ISBN 0-07-137688-7.
48. Temel Diabetes Mellitus Çalışma Ve Eğitim Grubu Hasta Eğitim Kitapçıkları Serisi.
49. Diabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi Ve İzlem Kılavuzu-2013
50. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults: the Third National Health and Nutrition Survey 1988-1994. Diabetes Care 1998; 28: 518-24.
51. Altuntaş Y. Diabetes mellitusun tanımı, tanısı ve sınıflaması. Ed: M Yenigün, M Altuntaş, Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2001; 51-62.
52. Satman I, Yılmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). Diabetes Care 25: 1551-6.

53. Onat A, Yıldırım B, Ceyhan K, ve ark. Halkımızda diyabet ve glukoz intolerans: koroner mortalite ve morbiditeye prospektif etkisi, prevalansında artma. *Türk Kardiyol Dern Arfl* 2001; 29; 268-73.
54. Onat A, Hergenç G, Keleşl, Doğan Y, Türkmen S, Sansoy V. Sex difference in development of diabetes and cardiovascular disease on the way from obesity and metabolic syndrome: prospective study of a cohort with normal glucose metabolism. *Metabolism* 2005; 54: 800-8.
55. Onat A, Kahraman G, Ökçün B, Dönmez K, Keleş İ, Sansoy V. Türk Erişkinlerinde Ölüm ve Koroner Olaylar: TEKHARF Çalışması Kohortunun 5-Yıllık Takibi. *Türk Kardiyol Dern Arş* 1996; 24(1): 8-15.
56. Murray CJL, Lopez AD, editors. The global burden of disease. Cambridge, MA: Harvard School of Public Health; 1996.
57. Tavlı T, Pekel N. Koroner Arter Hastalığında Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiol-Special Topics* 2011; 4(2): 16-20.
58. Hamm CW, Möllmann, H, Bassand JP, Van de Werf F. Acute Coronary Syndrom. In: Camm AJ, Lüscher TF, Serruys PW, editors. The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine. 2nd ed. New York: Oxford University Press 2009; P535-97.
59. Lippincott – Publishers Atlas of Coronary Artery Disease, Türkçesi Yelkovan Yayıncılık 2000; 23-54.
60. Kardiyoloji Miniatlas. 1. Baskı. AND Danışmanlık, Eğitim, yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 2003; 155-162.
61. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med.* 1998; 105: 32S–39S.
62. Khrbanda RK, Deanfield J. Functions of the healthy endothelium. *Coron Arter Diseases* 2001; 12: 485-91.
63. Landmesser U, Drexler H. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20(6): 547-51.
64. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–26.
65. Mano T, Masuyama T, Yamamoto K, et al. Endothelial dysfunction in the early stage of atherosclerosis precedes appearance of intimal lesions assessable with intravascular ultrasound. *Am Heart J* 1996; 131: 231–8.
66. Tooke JE. Microvascular function in human diabetes: a physiologic perspective. *Diabetes* 1995; 44: 721–6.
67. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046–1051.
68. Schachinger V, Britten MB, Zeiber AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899–906.
69. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 255-62.

70. McClain CJ, Mokshagundam SP, Barve SS, et al. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2004; 34: 67-79.
71. Liou I, Kowdley KV. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2006; 40(1): S11-S16.
72. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell ST. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37(5): 1202-19.
73. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1998; 15(4): 246-58.
74. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-9.
75. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. *Hepatology* 2002; 35 (4): 746-52.
76. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Diseases* 2001; 21: 27-41.
77. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2006; 40(1): S17-S29.
78. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2002; 34(3): 255-62.
79. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-92.
80. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam GR (eds). *Polycystic ovary syndrome*. Boston: Blackwell Scientific Publications 1992; 377-84.
81. Bremer AA. Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metabolic Syndrome Relat Disord* 2010; 8(5): 375-94.
82. Legro RS. Diabetes prevalence and risk factors in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001; 28(1): 99-109.
83. Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver and steatohepatitis: the hepatic manifestation of the insulin resistance syndrome. Presented at The First Annual World Congress on the Insulin Resistance Syndrome, Los Angeles, California 2003; 20-22.
84. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 489-503.
85. Simon I, Escote X, Vilarrasa N, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein as a determinant of insulin sensitivity in morbid-obese women. *Obesity (SilverSpring)* 2009; 17: 1124-8.
86. Storch J CB. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 73-95.

87. Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 1972; 177: 56-8.
88. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS: Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 2000; 141: 3388-3396.
89. Cabre, A. Lazaro, I. "Fatty acid binding protein is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients", *Atherosclerosis* 2007; 195: 150-158.
90. Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL. Adipocyte fatty acid-binding protein in obese children before and after weight loss. *Metabolism* 2007; 56: 1735-41.
91. Hertzel AV, Smith LA, Berg AH, Cline GW, Shulman GI, Scherer PE, Bernlohr DA. Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E814-23.
92. Shen, WJ, Sridhar, K, Bernlohr, DA& Kraemer, F B. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96: 5528–5532.
93. Coe, NR, Simpson, MA&Bernlohr, DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J. Lipid Res* 1999; 40: 967–972.
94. Bourlier V, Bouloumie A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 2009; 35: 251-60.
95. Antoniadis, C, Antonopoulos, AS, Tousoulis, D, Stefanadis, C. "Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease" 2009; 10: 269-279.
96. EZ Amri, B Bertrand, G Ailhaud, P Grimaldi. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression, *J. Lipid. Res* 1991; 32: 1449–1456.
97. RJ Distel, GS Robinson, BM Spiegelman, Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms, *J. Biol. Chem* 1992; 267: 5937–5941.
98. SA Melki, NA Abumrad. Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation, *J. Lipid. Res* 1993; 34: 1527–1534.
99. RF Kletzien, LA Foellmi, PK Harris, BM Wyse, SD Clarke. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulinsensitizing agent, *Mol. Pharmacol* 1992; 42: 558–562.
100. A. Cabre, I. Lazaro, J. Girona, J.M. Manzanares, F. Marimon, N. Plana, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients, *Atherosclerosis* 2007; 195: 50–158.
101. S.L. Coort, W.A. Coumans, A. Bonen, G.J. van der Vusse, J.F. Glatz, J.J. Luiken, Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats, *J. Lipid. Res* 2005; 46: 1295–1302.
102. Kurban S, Đdrisoğlu M. Okside düşük dansiteli lipoprotein antikorları ve klinik önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2005; 25: 73-84.

103. Carr, A. C. , McCall, M. R. , Frei, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2000; 20: 1716-1723.
104. Mc Gill HC: The Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem* 1988; 34-8 (B): B33-B39.
105. Binder CJ, Chang M, Shaw PX, et al. : Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nature Medicine* 2002; 11: 1218-1226.
106. Steinberg D: Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine* 2002; 11: 1211-1217.
107. Naito HK: Coronary Artery Disease and Disorders of Lipid Metabolism. *Clinical Chemistry*, Editörler: Lawrence Kaplan, Amadeo J.Pesce, Steven C.Kazmierczak, Mosby 2003; 4: 603-638.
108. Mc Gill HC: The Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem* 1988; 34-8 (B): B33-B39.
109. Karabinos IK, Koulouris S, Melpidou A, et al. increased Serum Titers of Autoantibodies Against Oxidized LDL in Young Healthy Adults: An evidence of Protective Effect of These Antibodies? *Hellenic J Cardiol* 2003; 44: 374-384.
110. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, Goodpaster B, Marris TB: The metabolic Syndrome, Circulating Oxidized LDL, and Risk of Myocardial Infarction in Well-Cohort. *Diabetes* 2004; 53: 1068-1073.
111. Derosa G, D'Angelo A, Ragonesi PD, et al. Metabolic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with diabetes and metabolic syndrome treated with metformin. *Intern Med J* 2007; 37: 79 -86.
112. Trease GE, Evans WC. A taxonomic approach to the study of medicinal plants and animal derived drugs. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15th ed. Singapore: Harcourt Brace and Company Asia Pvt. Ltd. 2002; 27.
113. Yeşil T. *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) türü üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2010; 116.
114. Chhatre S, Nesari T, Somani G, Kanchan D, Sathaye S. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Phcog Rev* 2014; 8: 45-51.
115. Chui, SZ Liao, CX Jiao, QP, Zhu, HM, Chen, SY, Chou, ZJ 1992.
116. Xinnao shutong for coronary heart disease in 41 patients. *New Drugs and Clinical Remedies* 11: 202–204.
117. Lu, SB, Lu, BJ, Shen, MZ, Rong, YZ. The clinic report of Xinnao shutong on myocardial infarction. *Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai* 1994; 14 (1): 78–79.
118. Tan RS, Culberson JW. An integrative review on current evidence of testosterone replacement therapy for the andropause. *Maturitas* 2003; 45: 15-27.
119. Anonim, Demirdikeni-Tribulus. <http://www.bitkisel tedavi.com/demirdikeni.htm> 2009
120. Li M et al. Effect of the decoction of *Tribulus terrestris* on mice gluconeogenesis. *Zhong Yao Cai* 2001; 24: 586-8.

121. Arcasoy HB et al. Effect of *Tribulus terrestris* L. saponin mixture on some smooth muscle preparations: a preliminary study. *Boll Chim Farm* 1998; 137(11): 473(5).
122. Hong CH et al. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J Ethnopharmacol* 2002; 83(1-2) 153(9).
123. Phillips, OA Mathew KT, and Oriowo MA. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats, *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 5
124. Grigorova, S. Abadjieva, D. Nikolova, M. Penkov, D. The effect of *Tribulus terrestris* extract on egg yolk lipids and serum cholesterol content in guinea fowls. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2009; 25(5-6): 1109-1115.
125. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(1): F423-9.
126. Ann. NY. Acad. Sci. New York Academy of Sciences. doi: 10. 1196/ annals.1372.005. 2006; 1084: 391–401
127. Machado SM, Pacheco-Soares C, Marciano FR, Lobo AO, da Silva NS. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 36: 180-6.
128. Alexander, MC Landsman, PB ve ark. NCEP-Defined Metabolic Syndrome, Diabetes and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older, *Diabetes* 2003; 52: 1210-1214.
129. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 351-982.
130. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001; 294: 2166 – 2170.
131. Aleixandre de Artiñano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2009; 102(9): 1246-53.
132. Johnson FK, Johnson RA, Durante W, Jackson KE, Stevenson BK and Peyton KJ. Metabolic syndrome increases endogenous carbon monoxide production to promote hypertension and endothelial dysfunction in obese Zucker rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2006; 290: 601-608.
133. Kannappan S, Jayaraman T, Rajasekar P, Ravichandran MK, Anuradha CV. Cinnamon bark extract improves glucose metabolism and lipid profile in the fructose-fed rat. *Singapore Med J* 2006; 47: 858-863.

134. Oron-Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeger G, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A, Sharabi Y. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens* 2008; 21: 1018-1022.
135. Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Kanter M, Can M, Ucar F, Unalacak M. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* 2005; 38: 540-7.
136. Vazquez-Prieto MA, Renna NF, Diez ER, Cacciamani V, Lembo C, Miatello RM. Effect of red wine on adipocytokine expression and vascular alterations in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2011; 24(2): 234-40.
137. Busserolles J, Mazur A, Gueux E, Rock E, Rayssiguier Y. Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med* 2002; 227:837-8421.
138. Turkozkan N, Bircan F.S, Pasaoglu O.T, Kantar S, Diker S, Anadol E, Kaya E.E. Metabolic Syndrome Model in Rats.3rd East Mediterranean ICLAS Symposium 2012; 13(6): 6-020
139. Rutledge AC, Adele K. Fructose and the metabolic syndrome: Pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev* 2007; 65: 13-23.
140. Zhang, L Perdomo, G Kim, DH, Qu, S, Ringquist, S Trucco, M Dong, HH , “Proteomic analysis of fructose-induced fatty liver in hamsters”, *Metabolism* 2008; 57(8): 1115-1124.
141. Roglans N, Vilà L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 2007; 45(3): 778-88.
142. Wolf A, Bray GA, Popkin BM. A short history of beverages and how our body treats them. *Obes Rev* 2008; 9(2): 151-64.
143. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructoseinduced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987; 10: 512-516.
144. S. Grigorova, B. Kashamov, V. Sredkova, S. Surdjiiska, H. Zlatev. Effects of Tribulus terrestris extract on semen quality and serum total cholesterol content in White Plymouth Rock-mini cocks. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2008; 24(3-4); 139-146.
145. S. Grigorova, D. Vasileva, B. Kashamov, V. Sredkova, S. Surdjiiska. Investigation of Tribulus Terrestris extract on the biochemical parameters of eggs and blood serum in laying hens. *Archiva Zootechnica* 2008; 11: 139-44.
146. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, et al. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem* 2000; 275(12): 8416-25.
147. Tripathy D, Carlsson M, Almgren P, et al. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance. *Diabetes* 2000; 6.

148. Haffner SM, Mikanen L, Festo A, et al. Insulin resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin sensitive prediabetic subjects: Implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation* 2000; 101: 975-980.
149. Chan WB, Chan JCN, Chow CC, Yeung VTF, So WY, Li JKY, Ko GTC, Ma RCW, Cockram CS. Glycaemic control in type 2 diabetes: the impact of body weight, beta cell function and patient education. *Q J Med* 2000; 93: 183-190.
150. Lê KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1760-1765.
151. Akar F, Pektaş MB, Tufan C, et al. Resveratrol Shows Vasoprotective Effect Reducing Oxidative Stress Without Affecting Metabolic Disturbances in Insulin-Dependent Diabetes of Rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25:
152. Laws A, Reaven GM. Evidence for an independent relationship between insulin resistance and fasting plasma HDL-cholesterol, triglyceride and insulin concentrations. *J Intern Med* 1992; 231: 25-30.
153. Vetterli L, Brun T, Giovannoni L, Bosco D, Maechler P. Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E beta-cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2011; 286(8): 6049-60.
154. Chen WP, Chi TC, Chuang LM, Su MJ. Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K(ATP) and K(V) channels of beta cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 568(1-3): 269-77.
155. Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, et al. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem* 2002; 277(35): 31646-55.
156. Guo Q, Avramoglu RK, Adeli K. Intestinal assembly and secretion of highly dense/lipid-poor apolipoprotein B48-containing lipoprotein particles in the fasting state: evidence for induction by insulin resistance and exogenous fatty acids. *Metabolism* 2005; 54(5): 689-97.
157. Grigoresco C, Rizkalla S, Halfon P, et al: Lack of detectable deleterious effects on metabolic control of daily fructose ingestion for 2 months in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1988; 11: 546-550.
158. Koivisto V, Yki-Järvinen H: Fructose and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *J Intern Med* 1993; 233: 145-53.
159. Bantle JP, Laine DC, Thomas JW: Metabolic effects of dietary fructose and sucrose in types I and II diabetic subjects. *Jama* 1986; 256: 3241-6.
160. Thorburn A, Crapo P, Beltz W, Wallace P, Witztum J, Henry R: Lipid metabolism in non-insulin-dependent diabetes: effects of long-term treatment with fructose-supplemented mixed meals. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 1015-1022.

161. Malerbi DA, Paiva ES, Duarte AL, Wajchenberg BL: Metabolic effects of dietary sucrose and fructose in type II diabetic subjects. *Diabetes Care* 1996; 19: 1249-56.
162. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A: Nonfasting Triglycerides and Risk of Myocardial Infarction, Ischemic Heart Disease, and Death in Men and Women. *JAMA* 2007; 298: 299-308.
163. American Diabetes Association: Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2007; 30: S48-65.
164. American Diabetes Association: Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2008; 31: S61-78.
165. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 50-54.
166. Khan A and Safdar M. Role of diet, Nutrients, Spices and Natural product in The Diabetes Mellitus. *Pakistan Journal of nutrition* 2003; 2(1): 1-12.
167. Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES. Beneficial effects of Soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1709-17-14.
168. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharm Biochem and Behav* 2010; 26(2).
169. Rocha, KK Souza, GA Ebaid, GX Seiva, FR Cataneo, AC Novelli, EL, "Resveratrol toxicity: Effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets", *Food Chem. Toxicol* 2009; 47(6): 1362-1367.
170. Yuan HD, Chung SH. Protective effects of fermented ginseng on streptozotocin-induced pancreatic beta-cell damage through inhibition of NF-kappaB. *Int J Mol Med* 2010; 25: 53-58.
171. Li M et al. Effect of the decoction of *Tribulus terrestris* on mice gluconeogenesis. *Zhong Yao Cai* 2001; 24(8): 586-8.
172. Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A, Widomska S. Adiponectin and its Role in Cardiovascular Diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008; 8(1): 7-46.
173. Delmas, D. , Jannin, B. , Latruffe, N. , "Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing", *Mol. Nutr. Food Res* 2005; 49(5): 377-395.
174. Sigurdardottir V, Fagerberg B, Hulthe J. Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *J Intern Med* 2002; 252: 440-7.
175. Frankel, EN, Waterhouse, AL Kinsella, JE, "Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol", *Lancet* 1993; 341(8852): 1103-1104.
176. Xu, A Wang, Y Xu, JY Stejkal, D Tam, S Zhang, J. "Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome", *Clin Chem* 2006; 52: 405-413.

177. Ye WH, Peng X H, Ai YQ, Chen H. Relations between serum adipocyte fatty acid-binding protein and type 2 diabetes in a community population. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2011; 31(3): 508-11.
178. Kahn SE, Haffner SM, Viberti G, Herman WH, Lachin JM, Kravitz BG, Yu D, Paul G, Holman RR, Zinman B; Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT) Study Group. Rosiglitazone decreases C-reactive protein to a greater extent relative to glyburide and metformin over 4 years despite greater weight gain: observations from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). *Diab Care* 2010; 33(1): 177-83.
179. Aronson D, Bartha P, Zinder O, Kerner A, Markiewicz W, Avizohar O, Brook GJ, Levy Y. Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(5): 674-9.
180. Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest* 2006; 36(9): 621-5.
181. Xu, A Tso, AW Cheung, BM, Wang Y. "Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study", *Circulation* 2007; 115: 1537-1543.
182. EZ Amri, B Bertrand, G Ailhaud, P Grimaldi, Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression, *J. Lipid. Res* 1991; 32: 1449–1456.
183. RJ Distel, G.S. Robinson, BM Spiegelman. Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms, *J. Biol. Chem* 1992; 267: 5937–5941.
184. SA Melki, NA Abumrad. Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation, *J. Lipid. Res* 1993; 34: 1527–1534.
185. RF Kletzien, LA Foellmi, PK Harris, BM Wyse, SD Clarke. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulinsensitizing agent, *Mol. Pharmacol* 1992; 42: 558–562.
186. A Cabre, I Lazaro, J Girona, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients, *Atherosclerosis* 2007; 195: 150–158.
187. Gerenli M, Tuğrul A, Demir M, et al. The relationship between proinflammatory cytokine levels and fibrinolytic system in obese patients. *Balkan Med J* 2008; 25(1): 44-51.
188. Al-Karkhi IH, Ibrahim AE, Yaseen AK. Levels of Insulin, IL-6 and CRP in patients with unstable angina. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22(5): 655-8.
189. Fried SK, Bunkin DA, and Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 847-850.
190. Bastard JP, Jardel C, Delattre J, Hainque B, Bruckert E, Oberlin F. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation* 1999; 99: 2221-2222.

191. Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP. 1999 The differential effect of food intake and adrenergic stimulation on adipose derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2126-2133.
192. Kern PA, Subramanian R, Chunling LI, Linda W, and Gouri R. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E745-E751.
193. Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, et al. Deletion of the tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem* 2009; 284: 36213-36222.
194. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity linked-insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
195. Yi J, Xiaohui L, Ya L, Haigang Z. Atherosclerosis lesion is accelerated by persistent systemic inflammation but attenuated by saponins from *Panax Notoginseng* in rabbits. *J. Med. Col. PLA.* 2008; 23: 38-44.

9. ÖZGEÇMİŞ

1989 Elazığ doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2008 yılında Fırat Üniversitesi Kimya Bölümü'ne yerleştim ve 2012 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Yüksek lisans'a başladım ve hala devam etmekteyim.

