

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

DENEYSEL OLARAK NONALKOLİK
STEATOHEPATİT OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
TRİBULUS TERRESTRİSİN KARACİĞER VE
ENDOTEL FONKSİYONLARI ÜZERİNE KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar BALAN

2014

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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

.....	_____
.....	_____
.....	_____

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, Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a, Doç. Dr. Dilara KAMAN'a

Deneysel çalışmalarımda kullandığım dokuların incelenmesinde yardım ve desteğiyle katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. İ.Hanifi ÖZERCAN'a katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca deneysel çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Anabilim dalımız Araştırma Görevlisi Dr.Musa YILMAZ 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

BAŞLIK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı.....	5
3.1.1. Tanım ve Önemi.....	5
3.1.2. Epidemiyoloji	6
3.1.3. Prevalans	9
3.1.4. Etyopatogenez	10
3.1.5. Histopatoloji.....	13
3.1.6. Klinik Özellikler ve Tanı	17
3.1.7. Tedavi	18
3.2. Tribulus terrestris	20
3.2.1. Demir Dikeni Bitkisi İle Hayvanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar	22
3.3. Ekstra Sellüler Matriks (ESM).....	26
3.3.1. Matriksmetalloproteinazlar (MMPs)	28

3.3.2. Matriksmetalloproteinazların Sınıflandırılması	28
3.3.3. Matriksmetalloproteinazların Yapısı	31
3.3.4. Matriksmetalloproteinazların Regülasyonu	31
3.3.5. Matriksmetalloproteinazların Doku İnhibitörler (TIMP)	
Sınıflandırılması ve Yapısı	35
3.3.6. Fonksiyonları.....	36
3.3.7. Ateroskleroz Patojenezi ve MMP'lerin Rolü	37
3.4. Nitrik Oksit (NO)	39
3.4.1. Nitrik Oksit Fonksiyonları	42
3.4.2. Nitrik Oksit Regülasyonu	44
3.5. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)	45
3.5.1. ADMA ve Oksidatif Stres.....	48
3.5.2. ADMA'nın Endotel Hasarıyla İlişkisi	49
3.5.3. ADMA ve Kardiyovasküler Hastalıklar	49
3.5.4. ADMA ve Karaciğer Hastalıkları.....	50
3.5.5. ADMA Regülasyonu	50
3.6. Hücre Adhezyon Molekülleri	52
3.6.1. Adhezyon Moleküllerinin Sınıflandırılması	53
3.6.2. Çeşitli Patolojilerde Hücre Adhezyon Moleküllerinin Rolü ve Tedavi	
Yaklaşımları.....	58
4.GEREÇ VE YÖNTEM	60
4.1. Deney Hayvanları ve Deneysel Çalışmasının Düzenlenmesi.....	60
4.2.Tedavi Protokolleri.....	61
4.3.Tribulus terrestris Bitkisinin Hazırlanış ve Uygulama Şekli	61

4.4. Laboratuvar ve Histopatolojik Analizler	62
4.4.1. Biyokimyasal İncelemeler	62
4.4.2. Histopatolojik İnceleme	63
4.5. İstatistiksel Değerlendirme	63
5. BULGULAR.....	64
5.1. Bazal ve Haftalık Ağırlık Ölçümleri	64
5.2. Biyokimyasal Ölçümler	65
5.2.1. Rutin Biyokimya Testleri, Lipid profili, Açlık Kan Glukozu Düzeyleri	66
5.2.2. Serum MMP-2 Düzeyleri.....	68
5.2.3. Serum MMP-9 Düzeyleri.....	69
5.2.4. Serum NO Düzeyleri	70
5.2.5. Serum ADMA Düzeyleri	71
5.2.6. Serum ICAM-1 Düzeyleri.....	71
5.2.7. Serum VCAM-1 Düzeyleri	72
5.3. Histopatolojik İnceleme Bulguları	73
6.TARTIŞMA.....	80
7. KAYNAKLAR	93
8.ÖZGEÇMİŞ	106

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Değişik NAYKH çalışmalarından demografik veriler	9
Tablo 2. Steatohepatitin Patogenetik Mekanizmaları	12
Tablo 3. Gruplara Ait Rat Ağırlıkları.....	64
Tablo 4. Deney sonu serum karaciğer enzimleri, glukoz ve lipid parametreleri ..	65
Tablo 5. Steatoz gelişmiş karaciğer hücrelerinin yağ içeriğinin normal karaciğer hücrelerinininkine oranlanması	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Karaciğer yağlanması ve NASH'in patogenezi	11
Şekil 2. <i>Tribulus Terrestris</i>	21
Şekil 3. Damar duvarının yapısı	26
Şekil 4. Matriks metalloproteinazların aktivasyonu	34
Şekil 5. Argininden NO ve sitrüllin oluşumu.....	39
Şekil 6. ADMA oluşumu ve metabolizmasının şematik gösterimi	46
Şekil 7. Endojen metalarjininlerin yapısı	47
Şekil 8. İmmünglobulin süper ailesi üyeleri adezyonu şematik gösteriliş.....	56
Şekil 9. Çalışma gruplarında elde edilen Serum MMP-2 düzeyleri.....	69
Şekil 10. Çalışma gruplarında elde edilen Serum MMP-9 düzeyleri.....	70
Şekil 11. Çalışma gruplarında elde edilen Serum NO düzeyleri.....	70
Şekil 12. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ADMA düzeyleri.	71
Şekil 13. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ICAM-1 düzeyleri.....	72
Şekil 14. Çalışma gruplarında elde edilen Serum VCAM-1 düzeyleri (P>0.05)..	72
Şekil 15. Kontrol grubu ratlara ait karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü	75
Şekil 16. Fruktoz ile NASH oluşturulan grup ratlara ait karaciğer dokusunda orta düzeyde artmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü.....	75
Şekil 17. NASH oluşumu sırasında <i>Tribulus terrestris</i> verilen grup ratlara ait karaciğer dokusunda azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü	76

Şekil 18. NASH oluştuktan sonra standart beslenme uygulanan grup ratlara ait karaciğer dokusunda azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü	76
Şekil 19. NASH oluştuktan sonra <i>Tribulus terrestris</i> verilen grup ratlara ait karaciğer dokusunda azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü	77
Şekil 20. Kontrol grubu ratlara ait damarın normal histolojik görünümü	77
Şekil 21. Fruktoz ile NASH oluşturulan grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü	78
Şekil 22. NASH oluşumu sırasında <i>Tribulus terrestris</i> verilen grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü	78
Şekil 23. NASH oluştuktan sonra standart beslenme uygulanan grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü	79
Şekil 24. NASH oluştuktan sonra <i>Tribulus terrestris</i> verilen grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü	79

KISALTMALAR LİSTESİ

ADMA	: Asimetrik dimetil arjinin
ADP	: Adenozindifosfat
AKH	: Alkolik yağlı karaciğer hastalığı
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin Transaminaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozintrifosfat
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
BH4	: Tetrahidrobiopterin
CaM	: Kalmodulin
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cNOS	: Konstitütif NOS
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DDAH	: Dimetil arjinin dimetilamino hidrolaz
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
EDRF	: Endotel kaynaklı büyüme faktörü
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
eNOS	: Endotelyal NOS
ESM	: Ekstra Sellüler Matriks
FAD	: Flavin adenin dinükleoti
FMN	: Flavin mononükleotid

GGT	: γ -glutamilttransferaz
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA
ICAM-1	: Hücrelerarası adezyon molekülü-1
IFN-γ	: İnterferon-gama
iNOS	: İndüklenebilir NOS
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LFA-1	: Leukocyte Function Associated antigen
L-NMMA	: N-monometil-L-arjinin
Mac-1	: Makrofaj antijen
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NHANES III	: National Health and Nutrition Examination Survey III
NASH	: Nonalkolik steatohepatit
NAYKH	: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal NOS
ONOO-	: Peroksinitrit
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PGE2	: Prostaglandin E2
PPAR- α	: Peroksizom-proliferatör-aktivitereseptör α
PPAR- γ	: Peroksizom-prolifedatör-aktiviterestör γ
PRMT	: Protein arjinin metil transferaz

SAH	: S-Adenozil homosistein
SAM	: S-Adenozil metionin
SDMA	: Simetrik dimetilarjinin
Sitokrom P2E1	: Uzun zincirli yağ asitlerinin ω -hidroksilasyonu
Sitokrom P4A	: ω 1-hidroksilasyon
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
SOD	: Süperoksid dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
STZ	: Streptozotozin
SYA	: Serbest yağ asitleri
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
THB	: Tetrahidrobiopterin
TIMP	: Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri
TNF- α	: Tümör Nefroz Faktörü- α
UCP-2	: Mitokondriyal protein-2
UDCA	: Ursodeoksikolik asid
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
VLA-4	: Very Late Antigen
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
WG	: Wegener Granülomatoz

1. ÖZET

Kompleks mekanizmalar ve farklı etiyolojik nedenlere bağılı olarak gelişen NASH tablosunda NO, ADMA, MMP ve adhezyon moleküllerinin etkili olduğu ve özellikle kronikleşme süreci ile komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Biz bu çalışmada; *Tribulus terrestris*'in, NASH gelişimi ve kronikleşme sürecindeki mekanizmalara ve endotel fonksiyonlar üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada 200-220 gr arasında 35 adet erkek Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanıldı. Ratlar her bir grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Grup1; kontrol gurubu (8 hafta), Grup2; fruktoz ile NASH oluşturulan grup (8 hafta), Grup3; NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* verilen grup (8 hafta), Grup4; NASH oluştuktan sonra standart beslenme (8+6 hafta), Grup5; NASH oluştuktan sonra *Tribulus terrestris* verilen grup (8+6 hafta) olarak düzenlendi. Çalışma tamamlandıktan sonra ratlar dekapite edilerek alınan kan örneklerinden numunlerde; serum glukoz, AST, ALT, Total kolesterol, HDL, LDL, ICAM-1, VCAM-1, MMP-2, MMP-9, NO, ADMA düzeyleri ölçüldü ve *Tribulus terrestris* bitkisinin bu parametreler üzerine etkileri incelendi. Ratlardan alınan karaciğer doku örnekleri ve damar örnekleri de histopatolojik incelemeye tabi tutuldu.

MMP-2, MMP-9 ve ICAM-1 düzeyleri NASH oluştuktan sonra *Tribulus terrestris* bitki ekstraktı verdiğimiz gruplarda anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edildi. NO ve ADMA düzeyleri NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* bitki ekstraktı verdiğimiz gruplarda anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edilmiştir. VCAM-1 düzeyleri ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi.

Tribulus terrestris bitki ekstratı verdiđimiz gruplar, kontrol grubu ve NASH oluřturulan gruplarla kıyaslandıđında ratlara verdiđimiz bitki eksraktının, karaciđer fonksiyon testlerini dűzelittiđi, ICAM-1, MMP-2, MMP-9, NO ve ADMA dűzeylerini azalttıđı, ayrıca fruktoz ile oluřturulan karaciđer hasarının histopatolojik olarak gerilediđi gűzlendi.

Sonuç olarak, *Tribulus terrestris* bitki ekstratının karaciğer ve endotel fonksiyonları űzerine olumlu etki yapabildiği ve NASH’li hastalarda kullanımının yararlı olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Nonalkolik staeatohepatit, *Tribulus terrestris*, nitrik oksit, asimetrik dimetil arjinin (ADMA), metalloproteinazlar.

2. ABSTRACT

EXPERIMENTAL NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS RATS ENDOTHELIAL FUNCTIONS OF THE LIVER AND PROTECTIVE INVESTIGATE THE EFFECTS OF TRIBULUS TERRESTRIAL

In the light of all these data, in the NASH table, occurred depending on complex mechanisms and several aetiologic reasons, NO, ADMA, MMP and adhesion molecules are thought to be effective and play an important role on becoming chronic and on development of complication. In this study, we aimed to research the effects of *Tribulus terrestris* on NASH progress and on mechanisms and endothelium functions in the period of becoming chronic.

In the study, 35 male Sprague-Dawley rats about weight of 200-220 g have been used. The rats were separated to 5 groups, each of which has 7 rats. Group1; control group (8 weeks), Group2; NASH with fructose (8 weeks), Group3; given *Tribulus terrestris* during NASH progress (8 weeks), Group4; standard feeding after NASH (8+6 week), Group5; given *Tribulus terrestris* after NASH progress (8+6 week) in created. Rats were decapitated after the study. Blood samples were taken, the glucose, AST, ALT, total cholesterol, HDL, LDL, ICAM-1, VCAM-1, MMP-2, MMP-9, NO and ADMA levels were measured in the serum and the effects of *Tribulus terrestris* on these parameters were examined. Liver, tissue and vessel samples taken from the rats were examined in the point of histopathology.

After the formation of NASH, that we gave the *Tribulus terrestris* plant extract groups MMP-2, MMP-9 and ICAM-1 levels significantly different

($p < 0.05$) were lower. During the formation of NASH, that we gave the *Tribulus terrestris* plant extract groups NO and ADMA levels significantly different ($p < 0.05$) were lower. VCAM-1 levels significantly different between the groups weren't observed. We offer *Tribulus terrestris* plant extract groups, compared with the control group and created NASH group we give the plant extract to rats, which corrects liver function tests, ICAM-1, MMP-2, MMP-9, NO and ADMA levels reduce, also decreased histopathological confirmation of fructose induced liver damage was observed.

Consequently, *Tribulus terrestris* plant extract have a positive effect on the liver and endothelial function which can be useful to in the patients with NASH and it looks like a promising option has been concluded.

Key words: Nonalcoholic steatohepatitis, *Tribulus terrestris*, nitric oxide, asymmetric dimethylarginine (ADMA), metalloproteinases.

3. GİRİŞ

3.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

3.1.1. Tanım ve Önemi

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) batı dünyasında ve ülkemizde en yaygın kronik karaciğer sorunu olarak boy göstermektedir (1). Karaciğer yağlanması kendi başına bir hastalık olarak incelenmesi, 1980 yılında Ludwig tarafından histopatolojik incelemeler sonucunda alkolik karaciğer hastalığına benzediği halde alkol kullanmayan kişilerde görülen bir hastalık tablosunun **"Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)"** ismi ile tanımlanmasından sonra şekillenmeye başlamıştır (2). İlerleyen yıllarda, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanmalarının büyük kısmının hepatit bulgularını içermeyen yağlanmalar olması nedeniyle isimlendirmede karışıklıkların oluşmaması için yeni bir tanımlama olan **"Nonalcoholic fatty liver disease" (NAFLD) / "Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı"** kavramı öne çıkarılarak NASH'ler bu kavramın alt kategorilerinde değerlendirilmeye başlanmıştır (3).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, histopatolojik incelemede hepatositlerin % 5'ten fazlasında yağ vakuollerinin görülmesinde veya lipid miktarının karaciğer ağırlığının % 5'inden fazla olması durumunda karaciğer yağlanması ortaya çıkmaktadır.

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı; temel olarak metabolik sendrom ile karakterize olan obezite, diyabet, dislipidemi ve insülin direnci gibi özelliklerle ilişkilidir. Asemptomatik yüksek karaciğer enzim düzeylerindeki değişiklik,

karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinom gibi komplikasyonların yanı sıra siroza kadar ilerleyen bir hastalık tablosu seyretmektedir (4).

NASH ve basit yağlanma arasında değişen histopatolojik bulguları gösteren karaciğer yağlanmalarının bulunacağı da gözden kaçırılmamalıdır.

3.1.2. Epidemiyoloji

NAYKH, kronik karaciğer hastalığının en önemli nedeni olarak gösterilmesinin yanı sıra alkol, toksinler, hepatotrofik virüsler gibi nedenlerle olan karaciğer hasarını da artırması açısından büyük önem arz etmektedir (5).

NAYKH birçok değişik klinik durum veya hastalıklarla ilişkili olabilir. Dolayısıyla hastalığı primer ve sekonder olarak ayırmak mümkündür (6).

1-Primer NASH: Metabolik sendrom ile bağlantılı olan Tip 2 diabetes mellitus ve hiperlipidemi gibi durumlarda ortaya çıkar.

2-Sekonder NASH: Cerrahi müdahelerinde, şişmanlarda hızlı bir şekilde kilo kayıplarında, total parenteral nutrisyonda ve Wilson hastalığı ile östrojenler ve glukokortikoidler gibi ilaçların kullanıldığı durumlarda ortaya çıkar. NASH iki gruba ayrılrsa da her iki NASH grubu da benzer özellikler sergilemektedir (7).

Karaciğer yağlanması farklı nedenlere bağlı olarak gelişebileceğinden dolayı terminolojik olarak 3 ana sınıfta toplanabilir. Bunlar;

A. Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalıkları

✓ Alkolik Yağlı Karaciğer

✓ Alkolik Steatohepatit

B. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalıkları (NAYKH)

✓ Nonalkolik Yağlı Karaciğer (Non-alkolik Steatoz)

✓ Nonalkolik Steatohepatit (NASH)

C. Yağlı Siroz

NASH; dünya çapında görülme olasılığı giderek artan, patogeneğinde hayat tarzı ve genetik faktörlerin önemli rol aldığı karmaşık bir metabolik durum olan NAYKH'nın en ciddi formudur. Kronik karaciğer hastalığı ve siroza kadar ilerleme gösterebilmesinin yanı sıra obezite, diyabet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve hiperlipidemiye kapsayan metabolik ve insülin rezistans sendromu ile kardiyovasküler hastalıklarla sıkı bir birliktelik göstermesi hastalığın önemi giderek artırmaktadır (8).

Risk Faktörleri

- 1- **Yaş:** Siroz için yaş bir risk faktörü olarak görülmüştür. Yaşın ne zaman steatoz süresince fibrozis için riskli olduğunu göstermek açısından yaşın bilinmesi önemlidir. Çünkü çocukluk döneminde hepatosteatoz ve yetişkin dönemde obezite oranları artış göstermektedir. Çalışmalarda 45 yaş üstünün risk faktörü taşıdığı öne sürülse de tartışmalar devam etmektedir (9).
- 2- **AST/ALT Oranı:** Viral hepatitlerde olduğu gibi NAYKH'da da fibrotik evreyi gösterir (9).
- 3- **Obezite:** Hepatik steatoz ve fibrotik karaciğer hastalığı için bir risk faktörüdür. Lipid yüklü hepatositler, hepatotoksik ajanlar için kaynak gibi davranır ve ikinci darbe hasarına daha duyarlı hale getirir (9,10). Gastrik bypass operasyonu olan 100 morbid hastada % 36 oranında değişik oranlarda steatohepatit bulunmuştur. Bu çalışmada obesite

derecesi, steatoz şiddeti ve sıklığı ile uyumlu bulunmuştur. NASH sıklığı da steatoz şiddeti ile orantılı bulunmuştur. Ratziu ve arkadaşları VKİ>25 kg/m² ve karaciğer enzim anormallikleri olan 93 obez hastanın karaciğer biyopsilerinde % 30 oranında septal fibrozis ve % 10 oranında siroz tespit edilmiştir (9,11).

4- Diabetes Mellitus: Karaciğer hastalığı tip 2 diyabeti olanlarda sıktır ve NAYKH diyabetiklerde % 75'e kadar görülebilir. Obez ve diyabetik kişilerdeki hepatik fibrozis, sadece obez olanlara göre daha çok göze çarpmaktadır. NASH, tip 2 diyabet ve glukoz intoleransı ile ilişkilidir (11,12).

5- Dislipidemi: Hepatik lipid dengesi NAYKH'da bozuk olabilir. Fakat bunun yağlanma nedeni mi olduğu ya da yağlanma sonucu mu oluştuğu tam olarak belli değildir (10). Hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi veya her ikisi NASH hastalarında % 20-81 oranında görülür. Bir çalışmada metabolizma bozuklukları kliniğine başvuran hastaların 2/3'ünde karaciğer enzimlerinde artma ve yaklaşık ultrasonografide yağlanma bulunmuştur. Hiperkolesterolemi hastalarının çoğu normal ultrasonografi bulgularına sahipken, hipertrigliseridemi veya karışık tip hiperlipidemisi olanlarda risk 5-6 kat fazladır. National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III) çalışmasında yaş, etnik özellikler, VKİ ve tip 2 diyabet farklılıkları düzeltildikten sonra trigliserid seviyesi >200 mg/dl olan erkek ve kadınlarda 3 kat ve HDL <35 mg/dl olanlarda 2 kat fazla risk bulunmuştur (13).

Bazı klinikopatolojik özelliklerin NAYKH'da fibrozis ile bağlantısı araştırılmıştır. Balonlaşma lezyonu ve Mallory cisimcikleri bağımsız olarak sinuzoidal ve periyenüler fibrozis ile ilişkisi bulunmuştur. AST/ALT oranı ve balonlaşma lezyonu bağımsız olarak periportal-portal tip fibrozis ile ilişkili bulunmuştur. Balonlaşma lezyonu ve Mallory cisimciklerinin hastalığın histolojik ilerlemesinde fibrozis için en iyi göstergeler olduğu iddia edilmiştir (14).

3.1.3. Prevalans

Amerika ve batı toplumlarında yapılan görüntüleme yöntemleri ve otopsi çalışmalarının sonuçlarına göre yetişkinlerin yaklaşık % 20-30'unda karaciğer yağlanması olduğu ve bunların % 10'unda NASH olduğu bildirilmiştir (15).

Yakın zamanda ülkemizde yapılan bir çalışmada NAYKH sıklığı kadınlarda % 16,5 iken erkeklerde % 23,7 olarak bulunmuştur. Önemli bir risk faktörü olarak da santral obezitenin olduğu belirtilmiştir (16). Tablo 1'de değişik çalışmalardaki demografik özellikler birlikte gösterilmiştir (9).

Tablo 1. Değişik NAYKH çalışmalarından demografik veriler (9)

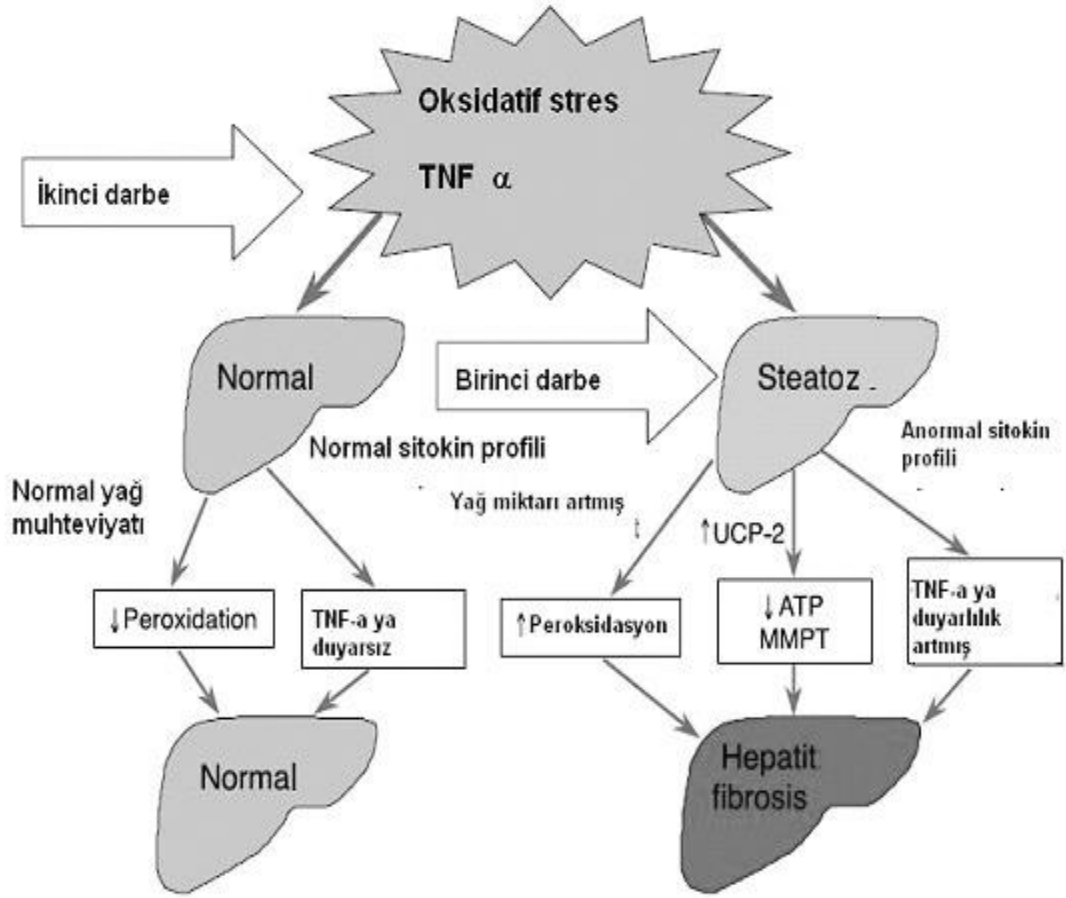
Yazar	Sayı	Yaş (yıl)	Kadın (%)	Diyabet (%)	Obezite (%)	Hiperlipidemi (%)
Ludwig	20	54	65	50	90	67
Diehl	39	52	81	55	71	20
Lee	49	53	78	51	69	Belirtilmemiş
Powell	42	49	83	36	95	81
Bacon	33	47	42	21	39	21
Matteoni	132	53	53	33	70	92
Angulo	144	51	67	28	60	27

Karaciğer hastalığının diğer nedenleri elendikten sonra, aminotransferaz asemptomatik yükselme vakalarının % 90'nın sebebidir (17).

Bunun yanı sıra, NAYKH'ki hastaların birçoğu normal karaciğer testleri ve lipid profiline sahip olup non-obez ve non-diyabetiktir (18,19). Normal vücut kitle indeksli (VKİ) hastalarda trunkal obezite NAYKH için önemli bir risk faktörü olarak gösterilmektedir. NAYKH prevalansı zayıf vakalarda yaklaşık % 2-3 tahmin edilmekte ancak obez popülasyonda % 19'lara kadar yükselmektedir (20,21).

3.1.4. Etyopatogenez

NASH'in fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamış olsa da en çok kabul gören hipotez Day ve arkadaşlarının öne sürdüğü iki darbe teorisidir (22). Bu teoriye göre ilk darbeye metabolik faktörlere bağlı olarak karaciğerde yağ depolanması artmakta ve steatoz oluşmaktadır. Karaciğerde oluşan bu yağlı değişim organın ikinci darbeye karşı duyarlılığını arttırmaktadır. Ardından ikinci darbe gerçekleşmektedir. Bu da oksidatif stres ve sitokinler aracılığıyla olmakta ve hepatosit hasarı, inflamasyon ve sonuçta fibrozis gelişimi ile karakterize olmaktadır (22) (Şekil 1).



Şekil 1. Karaciğer yağlanması ve NASH'in patogenezi (23)

NAYKH oluşumundaki ilk basamak olan “birinci darbe” insülin direncinin gelişiminde en önemli etken olduğu düşünülmektedir (22). Artmış serbest yağ asitleri(SYA), insülin rezistansına yol açar. Bunun yanı sıra hepatositlere doğrudan etkileride vardır. SYA’ların hücrel toksisiteleri şu anki görüşlere göre oldukça karmaşıktır. Ancak, NASH patogenezinde SYA toksisitesinin iki önemli mekanizma kabul görmektedir; birincisi hücre içi aşırı birikimlerin sonucu oluşan SYA’ların doğrudan sitotoksik etkileri, ikincisi ise SYA’ların lipid peroksidasyonlarının toksik etkilerinden kaynaklanan olaylı sitotoksik etkidir. Her iki toksik etkiyi deneysel olarak birbirinden ayırmak

oldukça zordur. Doğrudan olan toksik etkiler, yüksek konsantrasyonlarda (deterjan etkilerinden dolayı) membranda bozulma oluşturmaları, Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonu ve hücre içi Ca^{+2} homeostazının bozulmasıdır (24,25) (Tablo 2).

Tablo 2. Steatohepatitin Patogenetik Mekanizmaları

GÖRÜŞ	MEKANİZMA
İlk Darbe	
Steatoz	Dolaşımdaki insülin artışı Lipoliz ve FFA sentezinde artış β -oksidasyonda azalma
İkinci Darbe	
Oksidatif stres	CYP2E1 aktivite artışı
Genetik modifikasyon	PPAR α , CYP2E1/ 3A4 polimorfizmi
Besin depleasyonu	VLDL yapımında azalma
Sitokin artışı	TNF- α , NF- κ B artışı
Kupffer hücre disfonksiyonu	Endotoksin sensitivitesi, Fagositik aktivite kaybı, Artmış fibrojenez
Mitokondri disfonksiyonu	ATP homeostaz değişikliği UCP-2 artışı Oksidatif stres artışı
Hepatosit adaptasyonu	Rejenerasyon sürecinde yetersizlik
Fibrojenez	Stellat hücrelerde fibrojenik sitokinler ve büyüme faktörleri

Serbest oksijen radikalleri (SOR); mitokondride elektron transport zincirinden, sitoplazmada ksantin ve aldehit oksidaz enzimlerinin aktivitesinden

ve endoplazmik retikulumdaki sitokrom P2E1 (uzun zincirli yağ asitlerinin ω -hidroksilasyonu) ve sitokrom P4A (ω 1-hidroksilasyon) enzimlerinin aktivitesinden kaynaklanır (26). Serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu, birçok nedene bağlı olarak NASH patogenezinde merkezi bir rol üstlenmeye adaydır. Öncelikle, SOR ve lipid peroksidasyonu NASH'in tipik histopatolojik özelliklerini izah edebilecek kapasiteye sahiptir (27).

Hepatik steatoz ve SOR oluşumu arasındaki ilişki henüz anlaşılmamıştır. Hepatik steatozun, karaciğerde insülin rezistansını artırdığı gösterilmiştir (28). Hepatik steatozda SYA'nın fizyolojik inhibitörü olan malonil koenzim A'ya olan ilginin azalması ve karnitin palmitoil transferaz enzim aktivitesinin artmasına bağlı olarak mitokondrilere SYA alımı kolaylaşmaktadır. Hepatik SYA havuzunun taşması ile lipid peroksidasyonunu tetikleyen yeterli miktarda SOR oluşumu artmış β -oksidasyon ile açıklanabilir (29,30). Nitekim Sanval ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada NASH'de, SYA'ların artmış mitokondiyal β -oksidasyonun önemli bir SOR kaynağı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (31).

3.1.5. Histopatoloji

Yağlı karaciğer hastalığı, patolojik olarak karaciğer hücrelerinde trigliserid birikimi (steatozis) ve ilerleyici nekroinflamatuvar karaciğer hastalığı (steatohepatitis) ile sonuçlanan çeşitli klinik durumları ifade etmede kullanılan bir terimdir. Yağlı karaciğer hastalığı genellikle alkolik yağlı karaciğer hastalığı (AKH) ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) olarak iki ana etiyopatolojik klinik histolojik hasar, alkol suistimaline bağlı oluşan karaciğer

hasarından ayırt edilemeyen bulgulara sahiptir. Hepatik steatoz ve steatohepatit oluşturabilecek alkol alım başlangıç noktası tam olarak tespit edilmemiş olsa da genel olarak kadınlarda 20 g/gün ve erkeklerde 40 g/gün alkol alımı limit olarak kabul edilmektedir (32).

Alkolik karaciğer hastalığında olduğu gibi, NAYKH'de de yağlanma makroveziküler genellikle geniş bir yayılım göstermektedir. Ancak buna karşın baskın olarak mikroveziküler veya zone 3 (perivenüler) steatoz da bildirilmektedir. Nonalkolik steatohepatitte, akut veya kronik inflamatuvar hücrelerle lobüler inflamasyon, balon dejenerasyon, Mallory cisimcikleri ve fibrozis bulunur (33). Hücresel yanıt baskın olarak nötrofilik, lenfositik olabilir. Mallory cisimciklerinin varlığı değişkendir (% 9-90), genellikle zone 3'te bulunur. NASH'de farklı ağırlıkta perisinüzoidal, sentrilobüler veya septal fibrozis yer alabilir (34).

Karaciğer histopatolojisine göre öne sürülen bir NAYKH sınıflandırması (35,36):

Tip 1 : Steatoz

Tip 2 : Steatoz + lobüler inflamasyon

Tip 3 : Tip 2 + balonlaşmış hepatositler

Tip 4 : Mallory hyaline veya fibrozis

Yapılan bir çalışmada 32 kişilik NAYKH grubunun 9 yıllık izlemi sonucunda; Tip1 ve Tip2 grubunda % 3,4, Tip3 ve Tip4 grubunda ise % 24,7 oranında sirozun ilerlediği bildirilmiştir (36).

Steatohepatitteki lobüler inflamasyonun işareti sinüzidlerde ve balonlaşmış hepatositlerin yakınında az sayıda polimorfonükleer hücre inflamasyonun yer

almasıdır (37). Steatohepatitin aktif olduğu veya düzelme dönemlerinde lobüllerde ve portal yollarda hafif mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlenebilir. Ancak aşırı mononükleer infiltrasyonu kronik hepatit C gibi süperempoze kronik karaciğer hastalık kuşkusunu artırmaktadır. NASH’li çocukların karaciğer biyopsilerinde steatozis ve lobüler mononükleer hücre infiltrasyonu çok sık karşılaşılan bir durumdur (38). Lipogranülomlar, hem NASH hem de AKH’da tanımlanmakla birlikte tanı için gerekli olduğu düşünülmektedir. Lipogranülomlar, kronik inflamatuvar hücrelerden, Kupffer hücrelerinden ve bazen de steatotik hücreleri çevreleyen eozinofillerden oluşmaktadır. Geniş lipogranülomların fibrozis ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir ancak bu steatohepatitin parenkimal fibrozisi ile karıştırılmamalıdır (39) (Tablo 3).

Tablo 3. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Histolojik Lezyonların Derecelendirilmesi ve Evrelemesi (40)

Steatozun Derecelendirilmesi

Derece 1: Hepatositlerin % 33’ünden azı etkilenmiştir.

Derece 2 : Hepatositlerin % 33-66’sı etkilenmiştir.

Derece 3 : Hepatositlerin % 66’sından fazlası etkilenmiştir.

Steatohepatitin Derecelendirilmesi

Derece 1, hafif:

Steatoz: daha çok makroveziküler, lobüllerin % 66’ya varabilen bölümünü etkilemiş.

Balonlaşma: Zon 3 hepatositlerde zaman zaman görülür.

Lobüler enflamasyon: Dağınık ve hafif akut enflamasyon.
(polimorfonükleer hücreler) ve kronik enflamasyon (mononükleer hücreler)

Portal enflamasyon: Yok veya hafiftir.

Derece 2, orta:

Steatoz: Her şiddette olabilir, genellikle karışık makroveziküler ve mikroveziküler.

Balonlaşma: Belirgin ve zon 3'te belirgin.

Lobüler enflamasyon: Balonlaşmış hepatositlerle birlikte polimorfonükleer hücreler görülebilir; periselüler fibroz; hafif kronik enflamasyon görülebilir.

Portal enflamasyon: Hafif ile orta şekildedir.

Derece 3, şiddetli:

Steatoz: Tipik olarak lobülerin % 66'sından fazlasını tutar (panasiner); yaygın mixt steatoz vardır.

Balonlaşma: baskın olarak zon 3; belirgindir.

Lobüler enflamasyon: Dağınık akut ve kronik enflamasyon; polimorfonükleer hücreler, zon 3'te balonlaşma ve fibroz alanlarında yoğunlaşmış olabilir.

Portal enflamasyon: Hafif ile şiddetlidir.

Fibrozun evrelenmesi:

Evre 1: Zon 3 perivenüler, perisinüzoidal veya periselür fibroz; fokal veya yaygın

Evre 2: Fokal veya yaygın periportal fibroz

Evre 3: Bridging fibroz, fokal veya yaygın.

Evre 4: Siroz

3.1.6. Klinik Özellikler ve Tanı

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olanların birçoğu asemptomatiktir. Hastalarda tesadüfen hepatomegali veya karaciğer fonksiyon test bozuklukları görülebilir. Hastaların çoğu teşhis konulduğunda karaciğer hastalığı ile ilgili semptom ve bulgu göstermez. Bununla birlikte hastaların büyük bir kısmında yorgunluk, kırgınlık ve sağ üst kadranda hassasiyet veya dolgunluk vardır (41).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan hastaların çoğunda sıklıkla saptanan tek laboratuvar bulgusu alanin transaminaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) veya her ikisinde birden hafif veya orta derecede artıştır. Bazı hastalarda enzimler normaldir (42). AST-ALT oranı genellikle 1'in altında olup, fibrozisin ilerlemesi ve siroz gelişimi ile oran 1'in üzerine çıkar (43). Hastaların yarısına yakınında alkalen fosfataz (ALP) ve/veya γ -glutamilttransferaz (GGT) bir miktar artmış olarak bulunur ve bu artış genellikle 2 katından daha fazladır. GGT artışının, insülin direncinin duyarlı bir ayırıcı olduğuna dair bazı deliller vardır. Bu nedenle GGT artışı, NAYKH için erken biyokimyasal bulgular arasında bulunur (44). 1/3'ten fazla hastada nükleer antikor pozitif olabilir (45). Bazı hastalarda artmış ferritin ve/veya transferin saturasyonu söz konusudur (11).

Bir alışmada NAYKH hastasının 50'sinde karaciğer fonksiyon testi anormalliği saptanmış %26'sında fibrozis, %8'inde ise siroz görölmüştür (46). Nonalkolik yağlı karaciğer hastalęı popülasyonunda hemokromatozis gen mutasyon heterozigotluğu yüksek oranda saptanmış olup artmış demir varlığı bu hastalarda prognozu kötü etkilemektedir (47). Asit, varis kanaması ve hepatik ensefalopati dekompanse sirozu düşündürür. Sarılık geç evrede olur ve ilerlemiş karaciğer yetmezliği gösterir (48).

3.1.7. Tedavi

NAYKH, portal hipertansiyona ve karaciğer yetersizliğine yol açabilir. Bazı hastalarda ise kusursuz bir ilerleyiş gösterir ve steatoz yıllarca dengeli bir şekilde kalır. Bazılarında ise hiç ilerlemez. Bundan dolayı medikal tedavinin kararı hastalęın ilerlemesini durdurmayı amaç edinmeli ve ileri karaciğer hastalęı gelişme riski olan hastaları içine almalıdır. Patogenezi tam olarak aydınlatılmadığı için tedavisi ampiriktir. Genelde refakat eden hastalıkları kontrol etmek ve hepatotoksik ajanlardan kaçınma esasına dayanır (48,49,50).

1- Eşlik Eden Durumların Tedavisi

- a) Metabolik ve kalıtsal durumlar:** Klinik ve epidemiyolojik bilgiler, obezite ve Tip 2 diyabetin major beraber görölen hastalıklar ve hastalık sürecine dayanak hazırlayan durumlar olduğunu göstermiştir. Dolayısı ile bunların önüne geçilmesi ve uygun tedavileri de iyileşmeye veya hastalęın kontrol altına alınmasına yardımcıdır (48,51)

b) Kilo verme: Karaciğer histolojisini normal seyrine getirmek için gerekli olan kilo kaybı derecesi tam olarak belirtilmemiştir. Yüksek oranda yağlı infiltrasyonu olan hastalarda hızlı kilo kaybı ve bariz bir şekilde yağ azalması portal inflamasyon ve fibrozisi artırır (49,51). Buna benzer olarak uzun süren açlık da periselüler ve portal fibrozis, safra stazı ve fokal nekroz yapabilir. Bu paradoksal etki, yağ mobilizasyonuna ve artmış SYA düzeylerine bağlı olabilir (51). Aşamalı kilo kaybı ortalama 0,45-0,90 kg/ 1 hafta olmalı ve toplamda öncelikle normalin % 30 üstünde olanlar için % 10 kilo kaybı hedef alınmalıdır (49).

c) İnsülin direncinin tedavisi: İnsülin direncini düzeltmek için 2 çeşit ilaç grubu vardır (48);

- Biguanidler (örnek; metmorfin)
- Tiazolidinedionlar (örneğin; rosiglitazon ve pioglitazon)

Biguanidlerin mekanizması tam bilinmemekle birlikte serum aminotransferazlarda iyileşme yaptığı gösterilmiştir, ancak bu konu ile ilgili histolojik çalışmalar azdır. Tiazolidinedionlar, PPAR- γ reseptörüne etki ederek insülin duyarlılığını artırır. Bu tedavi ile biyokimyasal ve histolojik düzelme görülmüştür (52).

d) Lipit düşürücü ajanlar: Klofibrat, gemfibrozil ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri kullanılmıştır. Bu inhibitörler kullanılarak trigliserid içindeki yağ oranını azaltmak amaçlanmıştır. Antihiperlipidemiklerle az sayıda çalışma vardır. Çalışmalarda kişi sayısı, takip ve biyopsi

kontrolleri yeterli miktarlarda değildir. Klofibrat çalışmaları başarısız bulunurken, gemfibrozil ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile olumlu sonuçlar bildirilmiştir (50,51).

2- Hepatosit Koruyucu Ajanlar

NAYKH'da bazı ajanların kullanılmaları sonucunda olumlu sonuçlar elde edildiğinden dolayı hepatik koruyucu etkileri olduğuna inanılmıştır. Bunlar ursodeoksikolik asid (UDCA), N-asetilsistein, betain, vitamin E ve C, lesitin, β -karoten ve selenyumdur. UDCA, hepatoksik endojen safra asitlerini hepatoksik olmayanlarla değiştirir; membran koruyucu, sitoprotektif ve immünolojik etki yapar. Betain, S-adenozimetyonin düzeylerini arttırarak etonele bağlı trigliserid depolanmasını engeller. Hepatositlerde glutatyon seviyelerini arttırarak oksidatif stresi önleyen ise N-asetilsisteindir. Vitamin E güçlü bir antioksidan olup membran lipid peroksidasyonunu engeller ve sitokinleri baskılar (51).

3.2. Tribulus terrestris

Çoban çökerten (*Tribulus terrestris*) L. Zygophyllaceae familyasından *Tribulus* cinsine bağlı olup tek yıllık ve Avustralya kökenli bir bitkidir. Çoban çökerten Asya, Afrika ve Amerika'da yetişmektedir. Familyanın yeryüzünde 24 cinsi ve yaklaşık olarak 275 türü, ülkemizde ise 5 cinsi ve 6 türü bulunmaktadır. Demir dikenli bölgeden bölgeye değişiklik göstermekle beraber çarık dikenli, demir dikenli, demirleyen, demir bıtırağı ve deve çökerten isimleriyle de anılır (53) (Şekil 2).



Şekil 2. *Tribulus Terrestris* (Çoban Çökerten)

Çoban çökerten bitkisinin yapısında glikozit, alkaloid, reçine, tanen, azot, peroksidaz, diastaz, flavonoidler, karbonhidratlar, protein, fruktoz, sükroz ve sterodial saponinler (çoğunlukla furostanol:protodioscin ve protogracilin) yer alır (54). Yapılan son çalışmalarda çoban çökerten bitkisinde 20'nin üzerinde saponin tanımlanmıştır. Steroidal saponinlerin vücuttaki DHEA (steroid hormon) düzeyini arttırarak testosteron seviyesinde artışa yol açtığı bilinmektedir (55). Testosteron ve diğer androjen hormonlar kaslarda protein sentezini arttırmalar (56).

Çoban çökerten bitkisinden elde edilen ekstraktlar, insanlarda kas fonksiyonlarının arttırmakta kullanılmakta ve ticari olarak yaklaşık 108 preparatı piyasada kas gücünü, vücut dayanıklılığını ve fiziksel performansı artırmada yardımcı ürün olarak satılmaktadır (53).

Demir dikenli bitkisinin diğer özellikleri ise, kemikleri kalınlaştırması, güçlendirmesi ve karaciğer tarafından belirli hormonları üretmek için kullanılan

temel yağ asitlerinin emilimini kolaylaştırmaktır. Demir dikenî geleneksel tıpta, anti-inflamatuar (iltihap giderici), anti-artrit (eklem iltihabını giderici), bağışıklık sistemini güçlendirici, böbrek taşı önleyici ve kuvvet verici olarak kullanılmaktadır (57).

Deri hastalıkları, karaciğer hastalıkları, diyabet, koroner arter hastalığı, hipertansiyon, hiperlipidemi, nefrolitiazis, mantar enfeksiyonları ve seksüel işlev bozuklukları gibi birçok hastalıklarda bu bitki kullanılmaktadır. Kardiyovasküler alanda ilk başta özellikle böbrekte anjiyotensin dönüştürücü enzim aktivitesini azaltarak vazodilatör etkiyle tansiyon regülasyonunu yaptığına dair sıçanlarda yapılan çalışmalar mevcuttur (58). Yine tavşanlarda yapılan ve lipid profilleri üzerinde olumlu etkiler göstererek endotelial fonksiyonlar üzerine etkileri gösterilmiştir (59). İnsanlarda ise angina pectoriste koroner vazodilatasyon yaparak anginal atak sıklığını azalttığına dair bulgu dizileri vardır (60).

3.2.1. Demir Dikenî Bitkisi İle Hayvanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Li ve arkadaşlarının 10 mg/kg/gün sulu Tribulus ekstratı kullanılarak gerçekleştirdikleri kobay çalışmasında, kobaylar kontrol ile karşılaştırıldığında antihipertansif etkiler göstermiştir (61). Yine aynı araştırma grubunun sağlıklı kobay farelerini kullanarak gerçekleştirdiği araştırmada tribulusun glukoneojenezisi belirgin şekilde düşürdüğü, glikometabolizmi etkilediği, trigliserid seviyesini düşürdüğü ve toplam kolesterol seviyesini aşağı çektiği rapor edilmiştir. Tribulustan izole edilen saponin bileşiklerî ile peristaltik hareketlerde belirgin bir düşüşe neden olan doza bağlı antispazmatik aktivite elde edilmiştir

(62). Hong ve arkadaşlarının çalışmasında ise COX-2 inhibisyon aktivitesi belirlenmiş, antinflamatuar olarak kullanımı önerilmiştir (63).

Duru ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında, her bir tekerrürde 17 hayvan olacak şekilde etlik civcivlerde 3 tekerrürde yürüttüğü denemede, ilk 21 gün boyunca etlik civciv yemlerine toz halinde 60 ve 120 ppm seviyesinde demir dikenini (*Tribulus terrestris*) ticari kapsül ekstraktı (Ultimate Nutrition) eklemiş ve 21. günden kesime kadar (41. gün) yemden çıkarmıştır. 21. ve 41. günde olmak üzere iki kere yapılan kesim sonuçlarına göre 41. gün yüksek doz demir dikenini grubunda göğüs ağırlığı düşmüş ($P<0.05$), 21. gün düşük doz demir dikenini grubunda etteki yağ oranı yükselmiş ($P<0.001$) ve 41. günde yüksek doz demir dikenini yağ ve su oranını arttırmıştır ($P<0.05$). Büyüme performansında ise hiçbir önemli etkinin olmadığını bildirmiştir. Doz miktarlarının artırılması ile önemli sonuçların elde edilebileceği sonucuna varılmıştır (64).

Oludotun ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmalarında, tribulusun metanol ve su ekstraktlarının antihipertansif ve damar genişletici/açıcı etkileri kobay fareler kullanarak incelemişlerdir. Ekstraktlar spontane hipertansif farelerin kan basınçlarını doza bağlı oranlarda düşürmüştür. Tüm dozlarda su ekstraktları metanol ekstraktlarına oranla daha güçlü etki göstermişlerdir. Metanol ekstraktı doza bağlı oranlarda mezenterik (bağırsakları karın duvarına bağlayan zar) vasküler yatakta sıvı içiletiminin artışına *in vitro* olarak neden olmuştur. Metanol ekstraktı düşük dozda damar daraltıcı etki ortaya çıkartırken, yüksek dozlarda doza bağlı olarak belirgin şekilde sıvı içiletim basıncını düşürmüştür. Araştırma sonucunda *Tribulus terrestris* metanol ve su ekstraktlarının belirgin düzeyde anti hipertansif güce sahip olduğu inancına varılmıştır. Anti hipertansif etkiler,

muhtemelen nitrik oksit salınması ve membran hiperpolarizasyonunu kapsayan doğrudan bir arteriyal düz kas gevşemesi sonucu görülmektedir (65).

Amin ve arkadaşları ise streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanları *Tribulus terrestris* ekstresi (2 g/kg vücut ağırlığı) ile 30 gün boyunca tedavi etmiş, deneme sonunda histopatolojik muayenede karaciğerde önemli derecede iyileşme görülmüş ve *Tribulus terrestris*'in koruyucu etkisinin oksidatif stresi engelleyerek yönetilebileceğini ileri sürmüşlerdir (66).

Grigороva ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında, W. Plymouth Rock-mini erkeklerle yaptıkları bir çalışmada, her grupta 10 olmak üzere kontrol ve içme sularına 10 mg/kg (canlı ağırlık/gün) demir dikenini (*Tribulus terrestris*) ticari kapsül ekstraktı (Vemo) eklenen hayvanlardan oluşan 2 gruba 11 hafta boyunca denemeye tabi tutmuşlardır. Deneme sonunda semen kalitesini ve kan kolesterol içeriğini belirlemişlerdir. Demir dikenini verilen grupta kontrol grubuna göre, toplam semen kalitesinin, miktarının ve canlılığının arttığını, toplam kolesterol miktarının ise % 9,24 oranında düştüğünü ($P<0.05$), denemeden sonra demir dikenini etkisini 8 hafta boyunca devam ettirdiğini bildirmişlerdir (67).

Grigороva ve arkadaşları, 21 haftalık, 22 adet kahverengi Lohman yumurtalarında 65 gün boyunca yürüttükleri denemede hayvanları kontrol (n=11) ve 10 mg/kg demir dikenini (*Tribulus terrestris*) (canlı ağırlık/gün) (n=11) olacak şekilde iki gruba ayırmışlardır. Demir dikenini ticari kapsül ekstraktını (Vemoherb-T) içme suyunda çözündürülerek hayvanlara vermişlerdir. Denemenin 30. ve 65. gününde serumda toplam kolesterol, glukoz, alkalın fosfat ve yumurtada lipid düzeylerini tespit etmişlerdir. 30. ve 65. günlerde serum glukoz seviyesinin kontrol grubuna göre önemli derecede düştüğünü ($P<0.001$), serum toplam

kolesterol seviyesinin de istatistikî olarak önemli olmamakla birlikte düşürdüğünü ifade etmişlerdir (68).

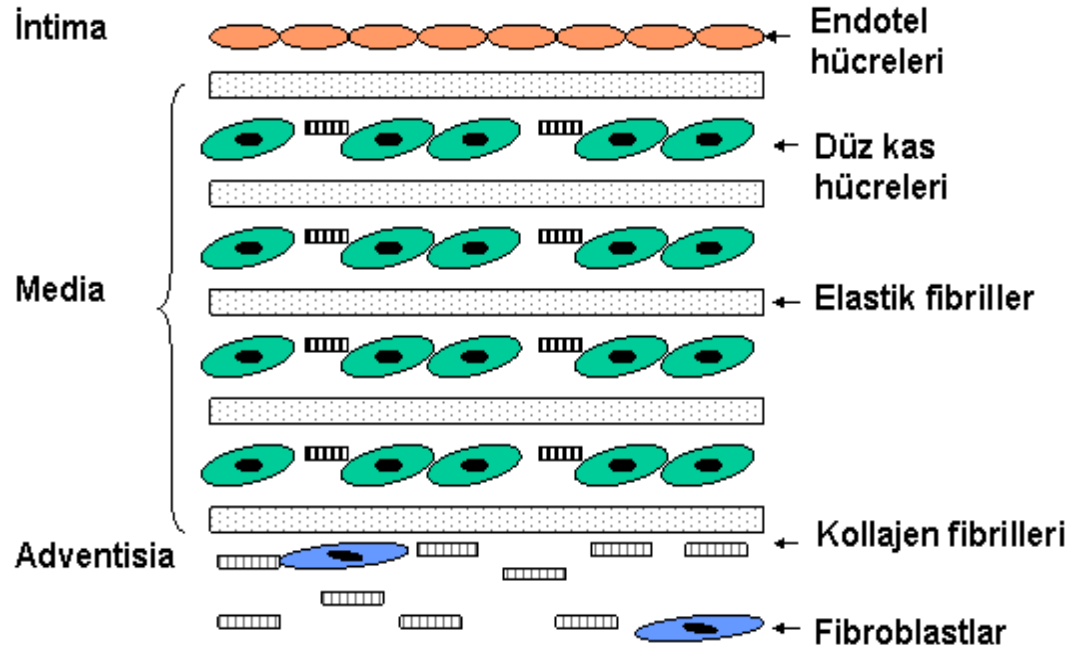
2009 yılında Şahin ve arkadaşları, demir dikenini (*Tribulus terrestris*) tozunun etlik civcivlerde canlı ağırlık kazancını arttıran antibiyotiklere karşı alternatif olabirliliğini test etmiştir. Günlük yaşta 240 adet karışık cinsiyetteki etlik civcivleri 4 gruba ayırmıştır. Bazal yeme % 0,06 alfamune ve % 0,025 flovamisini (kontrol) antibiyotikleri, 4, 8 ve 12 g demir dikenini tozu eklemiştir. 0-35 gün arası demir dikenini içeren yemlerle beslenen hayvanlarda yem tüketimi ve canlı ağırlık kazancının düşük olmasına rağmen beslemenin son haftasında hayvanlar canlı ağırlık kazancını ve yem tüketimini telafi etmiştir. Demir dikenini ile beslenen hayvanların yem etkinliği ve karkas randımanının düştüğü, proventrikulus, ileum+jejunum ve boş bağırsak ağırlığının arttığı bildirilmiştir. Demir dikeninin hemen hemen antibiyotik kadar etkili olduğu, tüketicilere antibiyotiksiz piliç eti üretiminde demir dikeninin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (69).

Tuncer ve arkadaşları, 18 Yeni Zelanda tavşanını her grupta 6 hayvan olacak şekilde 3 gruba bölmüşlerdir. İlk gruba kolesterolce zengin, ikinci gruba demir dikenini (*Tribulus terrestris*) ticari kapsül ekstraktı içeren ve aynı zamanda kolesterolce zengin, kontrol grubuna ise bazal yem içeren rasyon vermişlerdir. Denemenin başlangıcında, 4. ve 12. haftasında serumda toplam kolesterol, yüksek yoğunluklu lipid kolesterol (HDL-C), düşük yoğunluklu lipid kolesterol (LDL-C) ve trigliserit değerlerini belirlemişlerdir. Deneme sonunda, kolesterolce zengin demir dikenini içeren rasyonla beslenen hayvanlarda serum lipid değerlerinin kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığını belirtmişlerdir (59).

3.3. Ekstra Sellüler Matriks (ESM)

ESM, hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan dinamik, interaktif bir yapıdır (70,71). ESM, dokulardaki hücrelerin bir arada tutulmasına yardımcı olur, hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormon için rezervuar görevi yapar. Bu yapı hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyalleme yolları ile indirekt olarak etkileşmesini sağlar (71). Matriks ile hücreler arasında oluşan bu etkileşimler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için önem arz eder (72).

Vasküler ESM moleküllerini sentez edenler; damar duvarındaki intimal endotel hücreleri, medyal düz kas hücreleri ve adyentisyal fibroblastlardır (73) (Şekil 3).



Şekil 3. Damar duvarının yapısı (Jacob MP 2003'ten modifiye edilmiştir)

ESM'nin yapısında proteoglikanlar, kollajen fibrilleri ve multiadhezif matriks glikoprotein olmak üzere 3 temel protein bulunur. Multiadhezif matriks

glikoproteinleri çözünür yapıya sahip olup proteoglikanlar ve kollajenin hücre yüzeyine bağlanmasını sağlar. Proteoglikan hücreler oldukça viskoz yapıda olup yastık görevi yapar. Kollajen fibrilleri ise çözünür yapıda olmamakla birlikte hücreye esneklik ve güç kazandırır (71).

Hücrenin anahtar fonksiyonlarının düzenlenmesinde ESM molekülleri etkin bir şekilde görev alırlar (70). ESM molekülleri, integrin moleküllerinin kardiyomiyositler endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinin yüzeyinde yer alan integrin reseptörlerine bağlanmasını sağlayarak hücrel fonksiyonları değiştiren sinyaller gönderirler. Bu sinyaller sonucunda hücreler, sitozolik sinyal iletim yollarını direkt olarak aktive edebilirler. ESM'e bağlandıktan sonra eğer sinyal oluşmazsa hücreler apoptozise uğrar, matriks çok sayıda büyüme faktörünü bağlayarak hücrelerden gelen sinyalleri tutar ya da hücrelere gönderir. Böylece indirekt sinyalleme yollarını aktive ya da inhibe eder (70,71).

Proteoglikanlar matriks bileşenlerinden biri olup, lipoproteinleri bağlayarak düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (LDL) partiküllerinin arter duvarında birikmesine ve oksidatif modifikasyonuna neden olarak aterosklerozun başlangıç fazlarına katılırlar. Bütün bu özellikler ESM'in sadece etrafındaki hücrelere şekil veren bir yapı olmayıp üreme, yaşama ve ölüm gibi hücrel fonksiyonları etkileyen sinyaller gönderen dinamik, etkin bir ortam olduğunu göstermektedir (70).

Hücre matriks etkileşimleri düzenleyen, ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimlerdir (ekstrasellüler proteazlar). Bu enzimler matriks molekülleri tarafından meydana getirilen sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de ana rolü üstlenmektedir (72,74).

3.3.1. Matriks metalloproteinazlar (MMPs)

Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi, ekstrasellüler proteinazların üyesi olup en önemli görevleri ekstrasellüler matriksin (ESM) yıkımıdır. Birçok fizyolojik ve patolojik işleme katıldıkları saptanmıştır. Bu enzimler ESM'in turnover'i, doku remodelingi, anjiyogenez, morfogenez ve gelişiminde temel role sahiptirler. MMP'ler; embriyonik gelişim, ovalasyon, kemik ve remodelingi ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik olayda etkinlik gösterirler. Bunun yanı sıra bu enzimlerin hücre migrasyonu, invazyon, proliferasyon ve apoptoziste etkili olduğu bilinmektedir (75,76).

3.3.2. Matriks metalloproteinazların Sınıflandırılması

Matriks metalloproteinazlar substrat spesifiteleri ve domain yapısına göre 4 ana gruba ayrılmıştır.

- 1- İnterstisyel kollajenazlar
- 2- Gelatinazlar
- 3- Stromelisinler
- 4- Membran tipi matriks metalloproteinazlar (MT-MMP)

1-İnterstisyel Kollajenazlar

İnterstisyel kollajenaz (kollajenaz-1 veya MMP-1), nötrofil kollajenaz (MMP-8) ve kollajenaz-3 (MMP-13) olmak üzere üç üye tanımlanmıştır. Bu enzimlerin temel özelliği nötral pH'ta kollajen heliksini parçalamaktır (75). MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 gibi kollajenazlar tarafından vücut sıcaklığında

fibriler kollajenler jelatine dönüştürülür. Daha sonra bu jelatin parçalar MMP-2 ve MMP-9 daha küçük peptitlere parçalanır (77).

MMP-1: Keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler ve düz kas hücreleri tarafından salınmaktadır. Tip 3 kollajende daha etkilidir.

MMP-8: Polimorfonükleer lökositler aracılığıyla sentezlenir. Granüllerde depolanıp inflamasyon olduğu durumlarda salınırlar. Tip 1 kollajen yıkımında daha aktiftir.

MMP-13: Meme kanseri, osteoartrit, romatoid artrit gibi dejeneratif hastalıklarda sentezlenmektedir. Tip 2 kollajen yıkımında daha aktiftir.

2-Gelatinazlar (Tip 4 Kollajenaz)

Denatüre kollajen Tip 4, 5, 7, 9, 10'u degrade eder. Tip 4 kollajen bazal membranda çok bulunur. Gelatinazların MMP-2 (Jelatinaz A), MMP-9 (Jelatinaz B) olarak bilinen iki üyesi mevcuttur. MMP-2 ve MMP-9'un substrat özgünlükleri benzer olmakla beraber BÜYÜME faktör reseptörleriyle farklı cevap verirler. MMP-2, Gelatin, kollajen 1, 4, 5, 7, 10, tenasin, fibrilin, osteonektin, monosit kemoatraktan faktörü ve protein-3'ü degrade eder. MMP-1,-13, -14, -15, -16, -triptaz tarafından aktive olur. MMP-9, MMP-13'ü aktive eder (78).

MMP-9, 1974 yılında Sapota ve Danciewicz tarafından polimorfonükleer lökositlerden salgılanan bir jelatinolitik enzim olarak tanımlanmıştır (79). Daha sonra yapılan çalışmalarda 92 kDa'luk bir molekül olarak salgılandığı, önce 87 kDa olan bir inaktif maddeye ve sonra aktif form olan 82 kDa veya 83 kDa'luk bir moleküle dönüştürüldüğü gösterilmiştir. 4-67 kDa arasında değişen aktif formları da vardır. İn vitro olarak 4-aminofenil merkurik asit, stromelizin, MMP-2

ve plazminojen aktivatörleri hakkında yeterli bilgi yoktur. Yine *in vitro* ortamda, doku metalloproteinaz-1 inhibitörü MMP-9'un işleyişini değiştirebilir. MMP-9 aktivasyonunu izleyen, denatüre kollajen ve jelatin, Tip IV ve V kollajen ve elastini de içeren çok sayıda ekstrasellüler matriks üyelerini yıkabilir. Substrat düzeyinde bir madde hariç MMP-9 ile MMP-2 benzerlik gösterir. MMP-9, kazeine karşı duyarlı iken MMP-2 de bu duyarlılık yoktur (80).

cAMP, tümör nekroz faktör, interlökin, epidermal büyüme faktörü, fibroblastların yaşlanması jelatinazların salınımını aktive edici faktörler arasında yer alır (81).

3- Stromelisinler

Streptomelisin-1 (MMP-3), Streptomelisin-2 (MMP-10), Streptomelisin-3 (MMP-11), Matrilisin-7'den oluşur. Bunların substrat spesifitesi geniş olup proteoglikanlar, laminin, fibronektin, kollajen 4'ün non helikal bölgelerini parçalar (78).

4- Membran Tipi MMP'ler

Transmembran tipi bir domainleri olan transmembran tipi MMP'lerdir. Günümüzde MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-23, MMP-24 olmak üzere 6 adet MT-MMP bilinmektedir. Bütün MT-MMP'ler pro-MMP2'i aktive edebilir ve çoğu MT-MMP ise ekstrasellüler matriksi degrade edebilir. Bunlar özellikle stromal fibroblastlar tarafından salgılanır (82).

3.3.3. Matriksmetallopeptidazların Yapısı

MMP'ler çeşitli ortak yapısal özelliklere sahiptirler. MMP'lerin hepsi karakteristik olarak N terminalinde enzimin lider dizilimi olan pre-domain içerirler (83,84). İkinci bölge olan pro-domain enzimin latent formda kalmasından sorumlu olup enzim aktivasyonunu takiben kaybolur. Bir sonraki kısım katalitik domainidir. Bu kısım Zn^{++} bağlayan bölgeyi içerir. Buna ilaveten yapısal bir Zn^{++} iyonu ve 2-3 Ca^{++} iyonu içerir. Stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşması için bu bölge gereklidir (78).

Bazı MMP üyelerinde bilinen yapıya ek olarak farklı bölgeler yer alır. Jelatinaz sınıfına asit MMP-2 ve 9 kollajen iki bölümden oluşur. İlk bölüm jelatin etkileşimleri için gerekli olan fibronektin benzeri bölüm, ikinci bölüm ise 210 aminoasit içeren C-terminal hemopeksin benzeri bölümdür. Hemopeksin benzeri bölüm substrat özgünlüğünü belirlemede önemlidir. Ayrıca jelatinazların yapısında bu iki bölüm arasında prolince zengin bağlayıcı bölge yer alır (75,76,85).

3.3.4. Matriksmetallopeptidazların Regülasyonu

MMP'ler vasküler ESM'in yıkımında temel rol oynarlar. MMP'lerin hepsi preproenzim olarak sentezlenir ve bunların çoğu proenzim formunda (inaktif latent zimojen form) salgılanır. Latent zimojenlerin aktivasyonu hücre içinde MMP'ler aracılığıyla, hücre yüzeyinde diğer proteazların etkisiyle ekstrasellüler aralıkta ya da “**aktivasyon kaskadı**” denilen şekilde ya da önceden aktive olmuş MMP'lerin diğerlerini aktive etmesiyle oluşabilir (86).

MMP'lerin proteolitik aktiviteleri 3 basamakta düzenlenir (87). Bunlar;

1- Transkripsiyonel Düzenleme

2- Proenzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme

3- MMP Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

1-Transkripsiyonel Düzenleme

MMP gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin (IL-1) gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile uyarılır. Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E2 (PGE2) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler. MMP transkripsiyonunda yer alan birçok sitokin ve büyüme faktörünün ateroskleroz ve restenozda arabulucu olarak rol aldığı gösterilmiştir (87,88).

Plaktaki hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerden interferon- γ (IFN- γ), TNF- α ve interlökin-1- β gösterilmiştir. IFN- γ damar düz kas hücresinde kollajen sentezini baskılar. TNF- α ve interlökin-1- β hem düz kas hücrelerinde hem de endotel hücresinde MMP-1, 3, 8 ve 9'u indüklemektedirler. Damar düz kas ve endotel hücreleri temel olarak MMP-2 olmak üzere bir miktar da TIMP-1 ve 2 ekspresyonu göstermektedir. PDGF düz kas hücresinde MMP-9 ve MMP-1'i indüklemektedir. Aterogenezin olası başlatıcılarından olan okside LDL, endotel hücresinde MMP-1'i, düz kas hücresinde MT1-MMP'yi indüklemektedir (89).

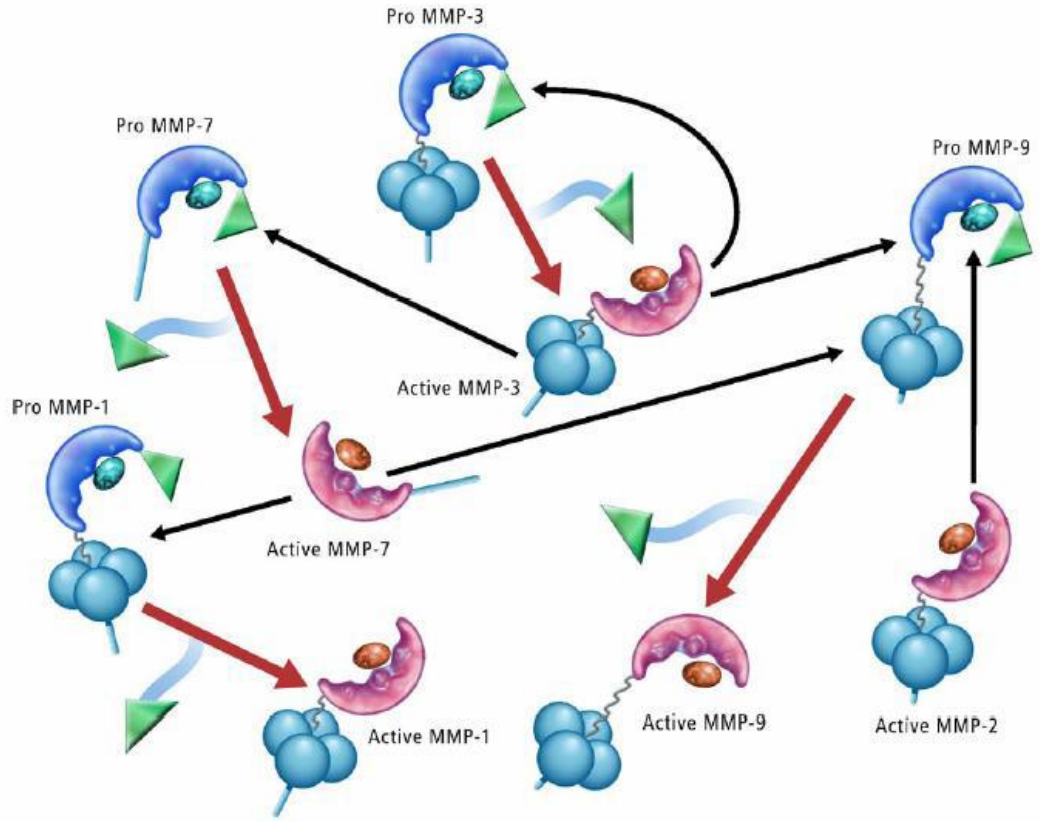
2-Proenzim Aktivasyonu

Neredeyse bütün MMP'ler aktivasyona ihtiyacı olan zimogenler şeklinde salınmaktadır ve bu salınım MMP proteinin enzimatik aktivitenin göstergesi

değildir. MMP'ler ile diğer proteinazlar ve faktörler arasında birçok aktivasyon zinciri vardır. Bu da MMP-2 aktivasyon sisteminin ne kadar karışık olduğunu göstermektedir (89).

MMP-2 aktivasyonu, MT1-MMP ve TIMP-2 kompleksleriyle etkileşimine bağlı olarak gerçekleşebilir. MT1-MMP golgide furince aktive olup hücre membranına transloke olmakta ve TIMP-2 ile bir kompleks oluşturup inhibe edilmektedir. Daha sonra proMMP-2 hemopeksin parçası aracılığıyla TIMP-2'ye bağlanarak aktif MT1-MMP tarafından proMMP-2'yi ayrıştırılmaktadır. Oluşan MMP-2 kısmi olarak aktif olup diğer aktif MMP-2'ler propeptidin son ayrışmasını tamamlamaktadırlar (89).

Hücre yüzeyinde proMMP aktivasyonunun gerçekleşmesinde ana mekanizma, inhibitörü olan TIMP-2'nin MT1-MMP'e bağlanmasıdır. Pro-MMP-2 hemopeksinle TIMP-2'ye bağlanarak hücre membranında lokalize olmaktadır. ProMMP-2, aktif MT1-MMP ile etkileşip kısmi aktif şekline dönüşmektedir. Bu dönüşümden sonra aktif MMP-2'ler son ayrıştırmayı yaparak kısmi aktif MMP-2'yi aktif duruma getirmektedir. Bu durum MMP inhibitörü olan TIMP-2'nin MMP aktivitesini hızlandırabileceğini göstermektedir. MMP-2 aktivasyonuna neden olan diğer proteinazlar ise MT1-MMP varlığında plaktaki plasmin, nötrofil elastaz, katepsin G, trombin, mast hücre kimazları ve triptazlardır. MMP-9 gibi diğer MMP'lerin aktivasyonu da baskın olarak plazmine bağlıdır. MMP'ler birbirlerini aktive edebilmektedirler. Örneğin; MMP-3 kendisi ve MMP-9 dahil diğer MMP'leri aktive edebilmektedir. MMP-3 ile aktive olan MMP-7 daha sonra MMP-1'i aktive edebilmektedir (89) (Şekil 4).



Şekil 4. Matriks metalloproteinazların aktivasyonu

3-İnhibisyon

TIMP'ler MMP aktivasyonun özgün inhibitörleridir. α -2-makroalbumini ve ekzojen madde olarak heparin daha az spesifik inhibitörlere örnek olarak verilebilir. α -2-makroalbuminin etkisi büyük molekül boyutu nedeniyle sınırlıdır. Bağ dokusu metabolizmasının regülasyonu için çok yönlü proteinler olarak TIMP'ler salgılanmaktadır (89).

MMP gen ekspresyonu fiziksel stres, sitokinler, büyüme faktörleri, forbol esterleri ve ilaçlar gibi kimyasal ajanları kapsayan efektörler ile upregüle edilirken

TGF- β , retinoik asit ve glukokortikoidler gibi süpresyon faktörleri ile de down regüle edilir (90).

3.3.5. Matriksmetalloproteinazların Doku İnhibitörler (TIMP) Sınıflandırılması ve Yapısı

TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere TIMP ailesinde 4 üye yer almaktadır. MMP'ler ile nonkovalent kompleksler oluşturarak MMP'lerin işlevini inhibe etmektedirler (91).

TIMP'ler N-terminal ve C-terminal bölgeden oluşan, 184-194 aminoasitten oluşan MMP inhibitörleridir. Her kısımda üç korunmuş disülfid bağı yer almaktadır (92).

TIMP-1 yoğun olarak glikozillenmiş 184 aminoasit içeren, molekül ağırlığı 28.5 kDa olan bir proteindir. Glikozilli hali 34 kDa'a kadardır. İçerdiği 12 adet sistein rezidüsü ve 6 adet disülfid bağı moleküle 6 kıvrımlı ve 3 düğümlü bir görünüm sağlamaktadır. N-bağı oligosakkaritler sialik asit, mannoz, galaktoz ve N-asetilglukozaamin içermektedir (93).

TIMP-2 glikozillenmemiş 194 aminoasit içeren, molekül ağırlığı 21 kDa olan bir proteindir. TIMP-1 ile % 40 sekans homolojisi göstermektedir. 6 korunmuş disülfid bağı aynı pozisyonlarda bulunmaktadır.

TIMP-3 molekülü 21 kDa olup glikozillenmemiştir. TIMP-1 ile % 30, TIMP-2 ile % 38'lik bir ayrım homolojisi vardır. TIMP-3 ekstraselüler matriks komponentlerine bağlı olarak bulunmaktadır.

TIMP-4 son tanımlanmış üye olup 22 kDa'dur. TIMP-1 ile % 37, TIMP-2 ve TIMP-3 ile % 51 ayrım homolojisi göstermektedir (94).

3.3.6. Fonksiyonları

TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasını regüle edecek şekilde salgılanan çok yönlü proteinlerdir. TIMP'ler MMP'lerin dokudaki doğal inhibitörleri olup MMP'lerin ve aktivitelerini sınırlamaktadırlar. Bazal membran ve ekstraselüler matriks yıkımını inhibe etmektedirler (89).

TIMP-1, MMP-2 ve MT1-MMP hariç kalan MMP'leri, TIMP-2 ise MMP-9 hariç diğer MMP'leri şiddetli bir şekilde inhibe etmektedir. Buna ilaveten TIMP-2'nin MT1-MMP ile hücre membranında kompleks oluşturarak MMP-2'nin proteolitik aktivasyonunda regülatuar olarak rol almaktadır. TIMP-3, MMP-1, 2, 3, 9 ve 13'e çözünmeyen bir ekstraselüler matriks bağıyla bağlanır. TIMP-4'ün MMP1, 3, 7'yi inhibe etmektedir (81). TIMP-3 ekstraselüler matrikse bağlanıp apoptozis ve inflamasyonda önemli bir konuma sahiptir. Kobaylarda damar hasarı TIMP-ü regüle ederken bu durum insan ateromasında gösterilmemiştir (89).

TIMP'lerin bir diğer işlevlerinden biri anjiyogenezi inhibe etmeleridir. Endotel hücre migrasyonu, endotelial tüp oluşumu, matriks bağımlı anjiyogenetik faktörlerinin inhibisyonu gibi farklı kademelerde anjiyogenezi inhibe etmektedirler. Bunların dışında hücre büyümesini ilerlemesine katkı sağlarlar, apoptozisi engellerler, hematopoez gelişimi esnasında eritroid seri farklılaşmasını ve hücre sağ kalımını indüklerler, embriyogenik ve steroidojenik aktiviteleri gösterirler, tümör invazyon ve metastazında rol almaktadırlar (93).

3.3.7. Ateroskleroz Patojenezi ve MMP'lerin Rolü

Son birkaç yılda MMP'lerin kardiyovasküler hastalıklarda esansiyel bir role sahip oldukları daha iyi bir şekilde anlaşılmıştır. MMP enzimlerinin aterosklerotik damarın iç katmanında hiperplazi gelişiminde ve aterosklerotik lezyonların plak yırtılmasına neden olacak biçimde zayıflamasında rol oynadığı kabul edilmektedir (95).

Aterosklerotik plak gelişimi dolaşımdaki monositlerin vasküler endotelyuma yapışması, damarın iç katmanının altındaki aralığa geçmesi, bunu takiben hasar görmüş endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve dolaşımdaki inflamatuvar hücreler arasında bir seri kompleks hücre-hücre etkileşimlerinin oluşması sonucu bu hücrelerden çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve adhezyon moleküllerinin salivermesi ile paralellik göstermektedir (87,97). İnsanlarda vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, makrofajlar, lenfositler gibi farklı hücre tiplerinde değişen oranlarda olmak üzere MMP sentezini stimüle edenler; makrofajlardan saliverilen TNF- α ve IL-1, trombositlerden saliverilen PDGF, fibroblastlar ve endotel hücrelerinden saliverilen bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerdir (96,97,98).

Deneyisel ateroskleroz modellerinde meydana gelen aterosklerotik lezyonlarda ve aortik okluzif hastalığı ya da aortik anevrizması olan hastalardan alınan aterosklerotik arter örneklerinde özellikle MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13 ve MMP-14'ün eksresyon ve aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir (86,95,99).

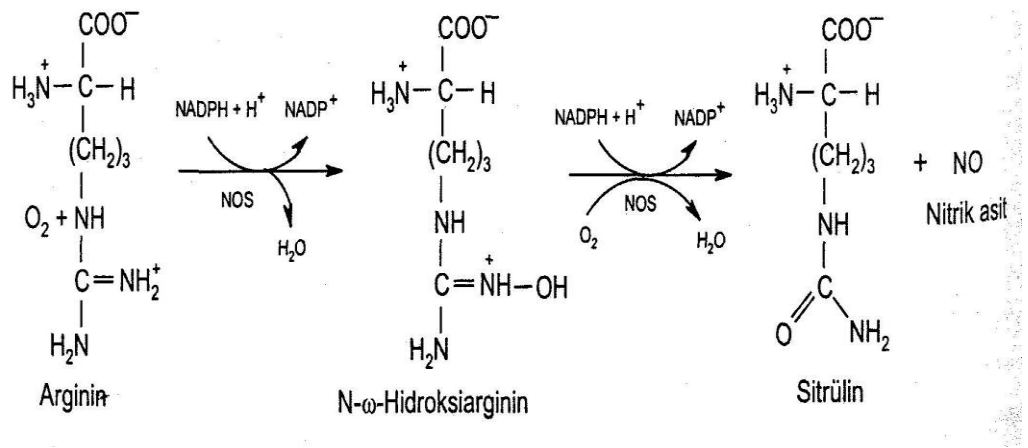
Devam eden düz kas hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sonrasında ESM birikimi ile damar duvar matriksi modifiye edilir ve sonuçta erken dönemde

damarın iç katmanında kalınlaşma ve ileri evrede de aterosklerotik plak oluşumu meydana gelir (87,96,100). Damar iç katmanının kalınlaşmasının önce yağ izlerine daha sonra da fibröz aterosklerotik plağa dönüşmesinde ESM yapım ve yıkım işlemleri önemlidir (101). Damar iç katmanında kalınlaşma gelişimi ve aterosklerozun erken dönem olayları genellikle jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) ile ilişkilendirilmiş olup veneointima geliştirilen çeşitli deneysel hayvan modellerinde çoğunlukla jelatinazların ekspresyon ve faaliyetleri incelenmiştir (101,102). Buna ilaveten daha az da olsa diğer MMP'lerin de damar iç katmanında kalınlaşma sürecine olan faydaları farklı çalışmalarda araştırılmıştır (103,104). Bu çalışmalar sonucu damar iç katmanında kalınlaşma için MMP aktivitesinin temel olduğunu kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra fibröz doku matriksinin aşırı yıkımına bağlı aterosklerotik plağın zayıflayıp yırtılmasında da MMP'lerin rol aldığı gösterilmiştir (85,95).

MMP'ler eksternal elastik laminanın parçalanmasına neden olarak arteriyel duvarın dışı doğru (pozitif) tekrardan modellenmesine yardımcı olurlar (86,99). Oluşan bu durum başlangıçta lümen genişliğini koruduğu için yararlı olmasına karşın sonuçta arteriyel duvarın mekanik gücünü azaltarak plağın yırtılma eğilimini arttırmaktadır (99). Aterosklerotik plağın yırtılmaya meyil gösterdiği kısımlarında makrofaj kaynaklı köpük hücrelerinin biriktiğinin gösterilmesi, makrofaj kaynaklı MMP'lerin plak frajilitesi ve yırtılmasında etkin rol aldığını düşündürmektedir (83).

3.4. Nitrik Oksit (NO)

İlk kez Palmer ve arkadaşları tarafından 1987 yılında endotelial gevşetici faktörün nitrik oksit (NO) olduğu gösterilmiştir. 1988 yılında merkezi sinir sisteminde NO'nun vücutta haberci bir molekül olarak görev yaptığı gösterilmiştir. 1989 yılında NO'yu sentezleyen enzimin olduğu bildirilmiş ve 1990 yılında enzim beyin homojenatlarından saflaştırılmıştır. NO sentezi için öncül molekül olarak L-arjinin amino asidi kullanılmaktadır. NO'nun arjininden sentezi Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi ile iki kademede olur. Tepkimenin ilk kademesinde L-arjinin aminoasiti guanidin-nitrojen terminalinden NOS enzimi ile hidroksillenme olur, ikinci kademede ise enzime bağlı olan ara ürün sitrülün ve NO'ya çevrilir. NO endotelial hücre yüzeyini etkileyen uyarıcılara cevap olarak üretilir. NOS ve kofaktörleri (BH₄, FAD, FMN ve NADPH) L-arjininden NO sentezi için gereklidir (105,106) (Şekil 5).



Şekil 5. Argininden NO ve sitrüllin oluşumu (107)

NO salımına neden olan uyarıcılar

- 1) Asetilkolin, Katekolaminler

- 2) Kan akımı (shear stres)
- 3) Bradikinler
- 4) Serotonin, ADP, ATP
- 5) Histamin, platelet aktive edici faktör
- 6) Trombin

NO molekülü serbest radikal özelliğine sahip renksiz bir gazdır. Dış orbitalinde paylaşılmamış tek elektron yer alır. Bu elektron bu moleküle radikal özelliği kazandırır. NO kendi aktivitesini baskıladığından reaktivitesi düşüktür, stabildir ve sentezlendiği yerden daha uzun mesafelere difüzyon kolaydır. Fizyolojik ortamlarda dayanıksız olduğundan hızla nitrit ya da nitrata oksitlenerek ortamdan uzaklaştırılır (105).

Kan damarlarında kanın akış hızındaki artış endotel hücreler üzerinde mekanik bir kuvvet (shear stres) meydana getirerek NO'nın sentez ve alımını artırır (108). Shear stres potasyum kanallarının aktivasyonuna yol açarak hiperpolarizasyona neden olur. Hiperpolarizasyon ise Ca^{+2} girişine neden olarak NO sentezini artırır. Bunun yanı sıra epinefrin, norepinefrin, histamin, vazopressin, asetilkolin, brakinin, ADP, ATP, trombin, insülin, endotelin ve 5-hidroksitriptamin gibi moleküller endotel hücre reseptörlerine tutunarak fosfolipaz C enzimini aktive eder ve sonunda Ca^{+2} yardımı ile eNOS enzim aktivasyonuna neden olur (105,106).

Nitrik Oksit Sentaz Enziminin İzofomları

Nitrik oksit sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin;

- a. Konstitütif (cNOS)
- b. İndüklenebilir (iNOS)

olmak üzere iki temel izoformu bulunur (95,96).

İki çeşit konstitütif enzim bulunmaktadır;

- 1- Endotelial NOS (eNOS) :** Endotel kaynaklı gevşeme faktörünün (EDRF) sentezinden sorumlu zarsal bir enzimdir. eNOS, redüktaz ve oksijenaz segmentleri olmak üzere iki globüler protein molekülünden meydana gelir. Bu iki segment esnek özelliğe sahip protein yapı ile birbirine bağlanmıştır. Oksijenaz segmenti katalitik merkezden oluşur. Bu katalitik merkez NO üretimi için gereklidir. L-arjinin, tetrahidrobiopterini (BH4) bağlar. NO sentezi için redüktaz segmenti, NADPH'a bağlanır ve dehidrojenasyonu katalize etmek için lazım olan elektronları üretir. Elektronlar esnek protein yapıdan oksijenaz segmentine taşınır. Bu elektron taşıma işlemi kalmodulinin (CaM), esnek protein parçasındaki özgün bağlanma kısmına kalsiyum ile bağlanmasıyla aktive edilir.
- 2- Nöronal NOS (nNOS):** Nöronal NOs, merkezi sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olarak görev alan NO sentezinden sorumludur. iNOS ve NOSIII, konstitütif enzimlerinin indüklenebilir izoformu olup alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Aktive olabilmesi için Ca^{+2} 'a ihtiyaç yoktur. iNOS enziminin sentezini indükleyenler; lipopolisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ve inflamatuvar sitokinlerdir (INF- γ , IL-1, IL-2, TNF- α gibi). iNOS yalnız

fagositik lökositlere has değildir ve uygun indüksiyonla bütün çekirdekli hücreler tarafından sentezlenebilir. NOS enzimlerinin faaliyete geçmeleri koenzimlere bağımlıdır. NOS enzimlerinin, NO sentezini katalizlemeleri için dimer yapı oluşturmaları lazımdır. Bu enzimlerin alt birim başına gereksinim duyduğu yapılar; FAD, FMN ve THB'dır (tetrahidrobioptrine) (105,106).

3.4.1. Nitrik Oksit Fonksiyonları

Günümüzde nitrik oksitin vasküler endotelden daima salındığı bilinmekle beraber bu sürekli salınım sonucunda da vasküler tonusun regülasyonunda önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Buna ilaveten hem birçok fizyolojik fonksiyonun olması için lazım olduğu ve antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu, hem de aşırı üretim olduğu takdirde radikal etki yaptığı vurgulanmaktadır (109).

Endotel hücresi tarafından sentezlenen NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçip guanilat siklazı aktive edip cGMP düzeyini arttırır. Düz kas hücresi içinde bulunan cGMP bağımlı protein kinazı aktive eden cGMP'dir. Bu aktivasyon neticesinde potasyum kanalları fosforile olurken Ca^{+2} kanalları hiperpolarize olur. Ca^{+2} kanallarının hiperpolarize olmasıyla hücre içi Ca^{+2} miktarında azalma olur ve bu azalma da düz kas hücresinde gevşemeye neden olur. NO, cGMP yoluyla vazodilatasyona katkıda bulunur. cGMP yolundan başka sodyum ve potasyum kanallarını doğrudan etkileyerek vazodilatasyonda rol oynar (105,108).

NO vasküler tonüsü etkiler ve vazodilatasyona neden olur. Endotel disfonksiyonunun en temel göstergesi, NO tarafından sağlanan, endotel bağımlı vazodilatasyonun yapısında meydana gelen bozulmadır. NO endotel bağımlı

vazodilatasyonu; Anjiyotensin II ve endotelin gibi endotel kökenli vazokonstriktörlerin etkisiyle savaşarak sağlar. Trombosit aktivasyonunun, nörotransmisyonun, savunma mekanizmasının düzenlenmesinde görev alır. Vasküler duvara hücresel adhezyonu önler iken platelet agregasyonunu da inhibe eder (105,108).

NO, lökosit endotel hücre adezyonunun gerçekleşmesini engeller. NO'nin adezyon moleküllerinin sentezini baskılamasının nükleer transkripsiyon faktörü olan nükleer transkripsiyon faktörü üzerindeki inhibitör etkisi ile gerçekleştiği kabul görölmektedir. NO mast hücrelerinden degranölasyon ile histamin salınımını, platelet aktivasyonu ve agregasyonunun gerçekleşmesini engeller. Bu etkiyi kontrol altında tutan, hücre içinde cGMP ve cGMP bağımlı protein kinaz aktivitesidir. NO; LDL modifikasyonunda değişikliğin olmasında, platelet ve lökosit fonksiyonlarında, düz kas hücre proliferasyonu ve vasküler homostazisin sürdürölmesinde etkin rol oynar. Vasküler düz kas hücre proliferasyonunu (neointimal hiperplazi gelişimi) inhibe eden de yine NO'dur. Bu inhibisyon etkisini düz kas hücrelerinin apoptozisini indükleyerek gerçekleştirir. NO, yukarıda ele alınan göstermiş olduğu etkilerinden dolayı güçlü antiaterojenik özelliklere sahip bir moleküldür (105,108).

Antioksidan fonksiyonu, platelet agregasyonunun inhibisyonu, antiinflatuar etkileri, düz kasların gevşemesi, TNF toksitlerine karşı etkileri, hücre adhezyonunun kontrolü, damar geçirgenliğine etkileri, immün sistemdeki fonksiyonlar NO'nin fonksiyonları arasında sayılabilir (105,108).

NO, çoğu fizyolojik olayların gerçekleştiği süreçte vasküler sistemin regölasyonunda, nörotransmisyonda ve çeşitli homeostatik olaylarda rol

almaktadır. Birçok patolojik olayların gerçekleşmesi sırasında (diyabet, şok, infarksiyon, nörodejenerasyon, artrit, kronik inflamasyon gibi) NO sentezinin üretimini aktive etmektedir (110). Birçok fizyolojik olayların meydana gelmesinde aktif rol oynayan NO metabolitleri (NO ve nitrit, nitrat, Snitrosothiol, nitrosamin, peroksinitrit gibi), NO'nun birçok sitotoksik ve genotoksik etkisine aracılık eder. Bu sitotoksik ve genotoksik etkiler mitokondrial respirasyon inhibisyonu ve gen mutasyonu ile sonuçlanan protein ve DNA hasarı, protein fonksiyon bozuklukları, nekrosis ve apoptosis gibi etkilerdir. Buna ilaveten NO ve NO metabolitlerinin tümör dokusunun metastazında ve hücre gelişiminde inhibe edici etkisi yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (111).

3.4.2. Nitrik Oksit Regülasyonu

eNOS aktivitesini düzenleyen kofaktörlerden biri tetrahidrobiopterindir (BH4). Bu faktörün sağlıklı insanlara uygulanması bir etki meydana getirmez. Fakat hiperkolesterolemik veya sigara içen kişilere uygulandığı zaman bu kişilerde bozulmuş olan NO aktivitesini düzeltebildiği gösterilmiştir. NO sentezi için BH4 kofaktör olarak bulunması gerekir. NOS substratı olan L-arjinin ve BH4 yetmezliğinin; eNOS'un ayrışmasına yol açtığı reaksiyonlar NO yerine süperoksit üretimiyle sonuçlanır. Bu etki '**NOS uncouplingi**' olarak isimlendirilir (106,108).

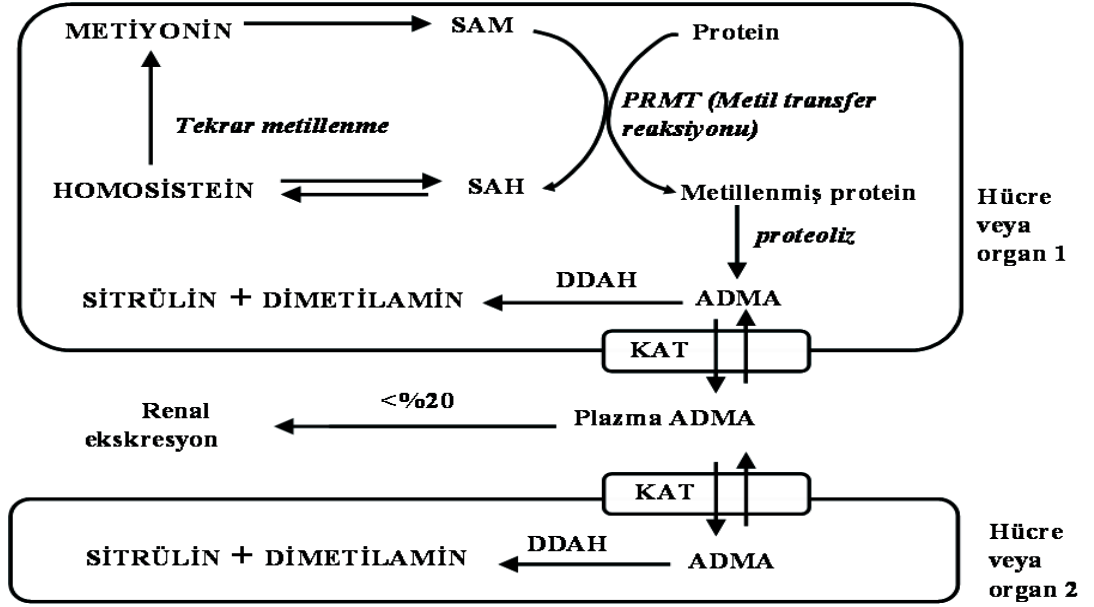
NO'nun aktivasyonunun gerçekleşmesinde rol oynayan düzenleyicilerinden biri süperoksit anyonudur. Süperoksit anyonu NO'nun kararsızlığına yol açar. Süperoksit anyonları genellikle NADPH oksidaz ile sentezlenir. Süperoksit anyonu normal metabolizmanın bir ürünü olarak bütün hücrelerde sürekli sentezlenebilir. Süperoksit ve NO instabil molekül olup ve reaksiyona girdikleri

takdirde peroksinitrit bileşimini meydana getirirler. Diğer serbest oksijen radikali türleri de peroksinitritten oluşur. Antioksidan özelliği gösteren endotele bağlı süperoksid dismutaz (eSOD) enzimi ile NO bu durumdan kendini korumaktadır. Süperoksit anyonu diğer serbest radikallerle reaksiyona girebilir veya süperoksit dismutaz aracılığı ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülebilir (105,106,108).

3.5. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)

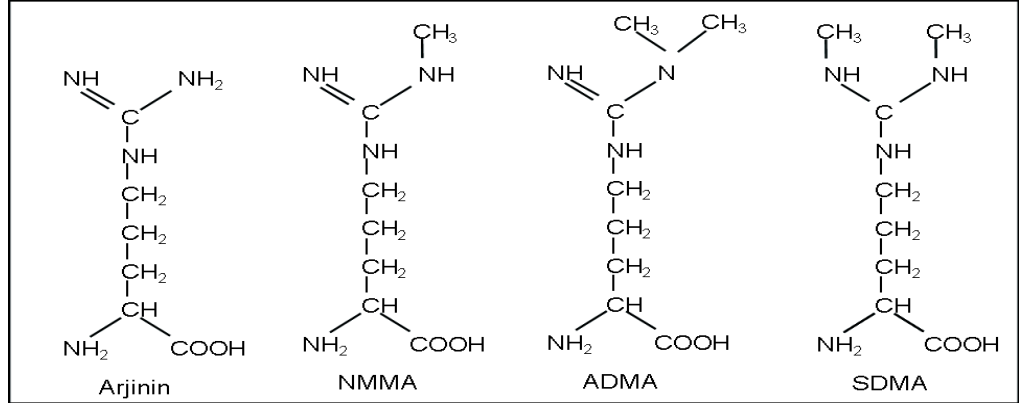
Asimetrik dimetil arjinin (ADMA), nükleoproteinlerde yer alan arjinin rezidülerine, protein arjinin metil transferaz (PRMT) enzimi aracılığı ile metil gruplarının sentez sonrası düzenlenip ilave edilmesi ve bu proteinlerin yıkılması sonucunda oluşan ve önemi günden güne artan bir metilenmiş arjinin türevidir (112).

ADMA; endotel yapının, vasküler yapının ve tonusun sürdürülmesinde önemli rol almaktadır. Endotelden elde edilen temel vazoaktif maddelerden biri nitrik oksittir. ADMA, NO sentezini sağlayan NOS enziminin endojen yarışmalı inhibitörüdür. Arjinin aminoasitinin posttranslasyonel modifiye formudur. L-arjininin hücre içi metiltransferaz enzimleri ile metillenmesiyle üretilmektedir. Metillenme PRMT-1 ve PRMT-2 enzimi ile olmaktadır. PRMT enzimleri, S-Adenozil metioninden (SAM) metil grubunu L-arjinine transfer ederek proteinlerdeki arjinin rezidülerinin guanidin gruplarına metil gruplarının eklenmesini sağlar. Metil grubu vericisi SAM, S-Adenozil homosisteine (SAH) dönüşür. SAH, homosisteine hidrolize olur (106,113,114,115) (Şekil 6).



Şekil 6. ADMA oluşumu ve metabolizmasının şematik gösterimi. (SAM: S-adenozil metiyonin, SAH: S-adenozil homosistein, KAT: katyonik aminoasit taşıyıcıları)

Serbest metilarjinin rezidüleri metillenmiş proteinlerin proteolitik katabolizması ile salınır. ADMA, Simetrik dimetilarjinin (SDMA) ve N-monometil-L-arjinin(L-NMMA) sentezlenir. SDMA ve L-NMMA ADMA'nın izomerleridir. ADMA NOS enziminin üç formunun gelişip ortaya çıkmasını engeller. Bu inhibisyonun geriye döndürülmesi L-Arjininin yüksek konsantrasyonları ile olmaktadır. Bu olaya '**arjinin paradoksu**' denilmektedir. L-NMMA, ADMA kadar güçlü olup NOS aktivitesini azaltır. Ancak ADMA'nın plazma konsantrasyonu L-NMMA konsantrasyonundan 10 kat daha yüksektir. SDMA ile ADMA ile eşit konsantrasyonlarda üretilmektedir. SDMA'nın NOS aktivitesine etki etmemektedir (115) (Şekil 7).



Şekil 7. Endojen metilarjininlerin yapısı (115)

Metil arjininlerin sentezinden sorumlu olan enzim PRMT'dir. PRMT enzimleri PRMT1 ve PRMT2 olarak üzere iki çeşittir. L-NMMA ve ADMA PRMT1 enzimi ile, L-NMMA ve SDMA PRMT 2 enzimi ile oluşur. Metillenme irreversibl olup metillenen proteinler nükleusta yer alır ve RNA'nın işlenmesinde ve transkripsiyonel denetiminde rol alır.

ADMA, SDMA ve L-NMMA'nın endotel hücrelerine girişi katyonik aminoasit taşıyıcısı (y taşıyıcısı) ile olmaktadır. Kaveolin bağlı NOS ile bu taşıyıcının aktivitesi gerçekleşir. ADMA, SDMA ve L-NMMA'nın her biri hücreye girmek için arjininle yarışır. ADMA'nın yüksek konsantrasyonları L-arjininin hücre içine taşınmasını engelleyerek NO sentezinde azalmaya neden olur. Metil arjininlerin lokal konsantrasyonlarında y taşıyıcısının aktivitesi önemli yer tutmaktadır. Y taşıyıcısı sistem metilarjininleri endotel hücrelerinde konsantre ettiğinden dolayı hücre içi konsantrasyonları sirkülasyondan daha fazladır. Y taşıyıcı sisteminde defekt meydana gelirse sirkülasyonda daha fazla ADMA konsantrasyonlarına yol açacağından bu durum NO biyosentezinde azalmaya neden olur (116,117).

ADMA'nın yükseldiği durumlar;

- ✓ Karaciğer yetmezliği
- ✓ Kronik böbrek yetmezliği
- ✓ Arterioskleroz
- ✓ Hipertansiyon
- ✓ Preeklampsi
- ✓ Hiperhomosisteinemi
- ✓ Hiperkolestrolemi
- ✓ Konjestif Kalp Yetmezliği
- ✓ Diabetes Mellitus
- ✓ Erektile Disfonksiyon
- ✓ Sigara

3.5.1. ADMA ve Oksidatif Stres

Vücutta oksidatif stresinin artışına neden olan durumlarda ADMA seviyelerinde de artış olur. DDAH enzim aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak ADMA seviyelerinde artış olabilir. DDAH aktivitesinin azalmasında DDAH'ın aktif bölgesinde yer alan sisteinin yükseltgenmesi önem arz eder. NO ile gerçekleşen bu yükseltgenme sonrasında aktivitesini geri dönüşümlü olarak azaltılabilmektedir (116,118).

İnflamasyonda iNOS aktivitesi artar ve çok fazla miktarda NO üretilir. Üretilen NO süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikalleriyle bir araya gelip peroksinitrite ($ONOO^-$) dönüşür ve bu dönüşüm NO'nun yarılanma ömrünü azaltır. Peroksinitrit oluşumu süperoksit dismutazın (SOD) süperoksit radikallerini yakalamasından

daha hızlı gelişmektedir. Peroksinitritte DDAH'ın aktif bölgesine bağlanarak aktivitesini azaltması sonucunda ADMA miktarında artış ve NO seviyelerinde azalma meydana gelir. ADMA yapımında rol alan enzimlerin aktiviteleri oksidatif strese bağlı olarak değişime uğrar. Bu değişime bağlı olarak ADMA miktarlarında da değişim meydana gelir (119). PRMT enziminin aktivitesini arttıran reaktif oksijen türleridir. Bu enzimin aktivitesinin artmasıyla ADMA düzeylerinde de artış meydana gelir (120).

3.5.2. ADMA'nın Endotel Hasarıyla İlişkisi

Damar düz kasları tarafından salgılanan faktörler daha çok vazokonstrüksiyonda rol oynarken endotel tabakasının salgıladığı faktörler ise daha çok vazodilatasyonda aktif olarak rol oynar. Endotel tarafından salgılanan NO damar düz kas proliferasyonunun engellenmesi, lökosit adezyonunu ve trombosit agregasyonunu önleyebilmektedir. Endotelde bir harabiyet olursa NO düzeylerinde azalmayla birlikte damar fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır. NO eksikliğinde damar düz kaslarında proliferasyon ile damar duvarının esnekliği azalmakta ve sonuçta akışa bağımlı vazodilatasyon kaybı ortaya meydana gelmektedir (121). Yapılan çalışmalar endotel disfonksiyonunu, artmış oksijen kökenli serbest radikal üretimiyle birbirine benzetmektedir (120).

3.5.3. ADMA ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Arjinden oluşan NO, örneğin ADMA gibi çeşitli arjinin analogları tarafından inhibe edilir. Bu analoglar ateroskleroza ve trombüsün meydana gelmesine neden olabilir. Akut koroner sendromlu olgularda yapılan çalışmalarda

ADMA seviyeleri yüksek bulunmuştur. Ama bu hastaların medikal tedavi sonrasında ADMA düzeylerinde azalma gözlenmiştir (122).

Kalp yetmezliği olan hastalarda da ADMA seviyelerinde artış göze çarpmaktadır. ADMA'nın kalp hızını azaltma etkisi vardır. ADMA'nın kalp yetmezliğindeki endotel fonksiyonundaki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır (116). Vazospastik anjinalı hastaların koroner damarlarında ADMA düzeyleri yüksek, NO düzeyleri ise düşük bulunmuştur (123). Yüksek olan ADMA seviyesini düşürmek, düşük olan NO seviyelerini artırmak amacıyla verilen L-arjininin de hastalarda egzersiz kapasitesini artırdığı ileri sürülmüştür (124).

3.5.4. ADMA ve Karaciğer Hastalıkları

Karaciğer tarafından alınan ADMA yüksek miktarda dolaşımdan alınarak metabolize edilmektedir (125). ADMA düzeyleri akut ve kronik karaciğer hastalıklarında ve organ nakli sonrası rejeksiyon görülen hastalarda da yüksek bulunmuştur. ADMA karaciğer nakli yapılan hastalarda naklin başarılı sonuca ulaşmasının takibinde önemli bir ayıraç olabilir (126). Alkolik sirozda ADMA seviyeleri yüksektir (127).

3.5.5. ADMA Regülasyonu

Metilarjininlerin bir kısmı renal yolla atılım gerçekleştirir. Bunun yanı sıra SDMA tamamen renal yolla atılır ama ADMA ve L-NMMA genel olarak metabolize edilir. DDAH (Dimetilarjinin Dimetil Amino Hidrolaz) enzimiyle sitrülün ve dimetilamine yıkılması en önemli metabolik yoldur (128,129).

DDAH, ADMA düzeylerini regüle etmede aktif olarak rol oynar. SDMA intravenöz olarak enjekte edilirse % 60 oranında, ADMA intravenöz olarak enjekte edildikten sonra % 5 oranında idrara çıkar. Buna bağlı olarak renal yetmezlikte SDMA, ADMA'ya göre plazmada daha yüksek düzeylerde bulunur. Yapılan araştırmalar sonucunda ADMA'nın DDAH için substrat olduğu bulgusu elde edilirken SDMA'nın ise olmadığı elde edilmiştir. Buna ilaveten ADMA'nın SDMA'ya göre yaygın bir metabolizmasının olduğu bulgusu da elde edilmiştir (130). DDAH iki izofomdan meydana gelir ve her iki izoformda vasküler endotelyumdan eksprese edilir. İnsanları da içine alan gelişmiş organizmalarda DDAH enziminin 2 izoformu tanımlanmıştır. DDAH 1'i kodlayan gen 1. kromozomda, DDAH 2'yi kodlayan gen ise 6. kromozomda lokalize olmuştur. Bu izoformların doku dağılımları farklılık gösterirken aktiviteleri ise benzerlik göstermektedir. DDAH 1 ekspresyonu ile nöral NOS arasında bağlantı kurulurken DDAH 2 ile endotelyal NOS (eNOS) arasında bağlantı kurulmaktadır. NOS ekspresse eden doku ve hücrelerde DDAH'lar fazlaca eksprese edilmektedir ama bu doku ve hücrelerle sınırlı değildir. Her iki izoform da kardiyovasküler sistemde tanımlanmaktadır. Bu tanımlamaya rağmen muhtemelen DDAH 2 ekspresyonu çok daha fazladır (131,132).

Endotelyal hücre kültürlerinde DDAH'ın selektif inhibisyonu meydana geldiğinde bu durum nitrik oksit sentezinde azalmaya yol açar. Ortamdaki arjinin içeriğinin arttırılması bu durumu tersine çevirebilir (133). PRMT'ler yoluyla ADMA'nın oluşumu ve ADMA'nın atılım yolları aşağıdaki gibidir.

ADMA'nın atılımı 4 yolla olmaktadır (134,135);

1- PRMT enzimi ile proteinlerin artmış metilasyonu

- 2- Şekillenmiş metiltarjininlerin artmış proteolizi ve salınımı
- 3- Bozulmuş renal atılım
- 4- DDAH ile bozulmuş metabolizma

Şiddetli inflamasyon, organ yaralanmaları ve tüm ciddi hastalıklarda proteolizis artmış bir şekilde karşımıza çıkar. Eliminasyonda azalma ve proteolizis de artış ADMA birikimine neden olur. Ciddi hepatik yetmezlikli hastalarda plazma ADMA konsantrasyonun yükselen bir seyir göstermesi ADMA metabolizmasında karaciğerin önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (134,136).

3.6. Hücre Adhezyon Molekülleri

Adezyon molekülleri, hücre yüzeyinde yapısal olarak yer alan veya bazı çeşitli kimyasal mediyatörler gibi bazı uyarılar ile hücre yüzeyinde beliren ve hücrelerin birbirine ve extraselüler matrice bağlanmasını sağlayan ve hayatın yapıştırıcısı olarak tanımlanan moleküllerdir (137). Hücre adhezyon moleküllerinin bu etkileşimleri sayesinde, hücrelerin birbirleriyle ve çevreleriyle olan ilişkileri sağlanır. Hücrelerin birbirlerini tanımalarında, hücrelerin özgün olarak dokulara yönelmelerinde, embriyogenez, hücre büyümesi hücre farklılaşması ve patolojik durumlarda; kanser metastazı, inflamasyon, tümör invazyonu gibi olguların düzenlenmesinde de aktif olarak rol oynarlar (138,139).

Adhezyon moleküllerinin yapımı ve hücre yüzeyindeki ekspresyonu, doku hasarı veya enfeksiyone yanıt olarak salgılanan özgün sinyaller ile kontrol etmektedirler. Adhezyon moleküllerinin lökositlerle ilgili görevleri arasında; lökositlerin birbirlerine, damar endoteline veya lökositlerin hücreler arası bağ dokusuna yapışması yer alır (138,140).

Adhezyon molekülleri, lökositlerin damar endoteline bağlanmasını sağlamalarının yanı sıra lökositlerin endotel hücreleri arasındaki bölmelerden geçerek damar dışına göç etmesini sağlarlar. Lökositler spesifik reseptörleri ile adhezyon moleküllerine tutunarak endotele bağlanır ve damar dışına çıkarlar. Böylece lökositlerin aktif hale gelmesi ile fagositoz gerçekleşir ve salgılanan nötrofil granüllerindeki lizozomal enzimler, süperoksit anyonları, H₂O₂ gibi oksijenli aktif metabolitler ve araşidonik asit metabolizması ürünleri (prostaglandinler, lökotrienler) zararlı etkileri yok ederler fakat sağlam dokulara ve endotele de zarar verirler (138,140).

3.6.1. Adhezyon Moleküllerinin Sınıflandırılması

- 1) İntergrinler
- 2) Selektinler
- 3) Kaderinler
- 4) İmmünglobulin süper ailesine dâhil adhezyon molekülleri

Bir de fonksiyonel olarak adhezyon görevi gören fakat yukarıdaki gruplar içerisinde yer almayan adhezyon molekülleri vardır (138,140).

Sınıflandırılmayan Adhezyon Molekülleri

Adhezyon fonksiyonunda aktif olarak görev alan ancak bu dört grup içerisinde sınıflandırılmayan adhezyon molekülleri olarak tanımlanırlar. Bunlar; CD44 (Hermes), CD36, Laminin, Fibronektin, OX40 olarak sıralanabilir (141).

1.İntergrinler

İntegrinler; selektin/ligand ilişkisi sonrası lökositlerin yavaşlayarak endotel hücresi üzerinde yuvarlanması ve bu yuvarlanmanın ardından lökositlerle endotel hücre yüzeyi arasındaki adhezyonunda rol oynarlar (142). İntergrinler hücre dışı sinyaller ile birlikte iletişimi sağlarlar (143).

2. Selektinler

Selektinler, endotel hücresi ve lökositlerin yüzeyinde bulunurlar. Molekülün N terminalinde lektin benzeri bir yapı olduğu için selektin adını almaktadırlar (144). Lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu başlatan ilk molekül selektinlerdir (145).

E-Selektin(Endotelial Lökosit Adhezyon Molekülü): Uyarılmamış endotel hücresi üzerinde bulunmazlar. Fakat E-selektin molekülü ekspresyonları IL-1, TNF- α gibi inflamatuvar uyarılara veya endotoksinlere cevaben artar (132). Monosit, nötrofil ve eozinofillerin seçici olarak endotele bağlanmasında da E-selektin reseptörü rol oynar (145).

L-Selektin(Lökosit adhezyon molekülü): Periferik lenf bezlerindeki lenfositlerin adezyonunda ve immün cevabın oluşmasında düzenleyici olarak görev alan selektinler ailesinin bir üyesidir (146).

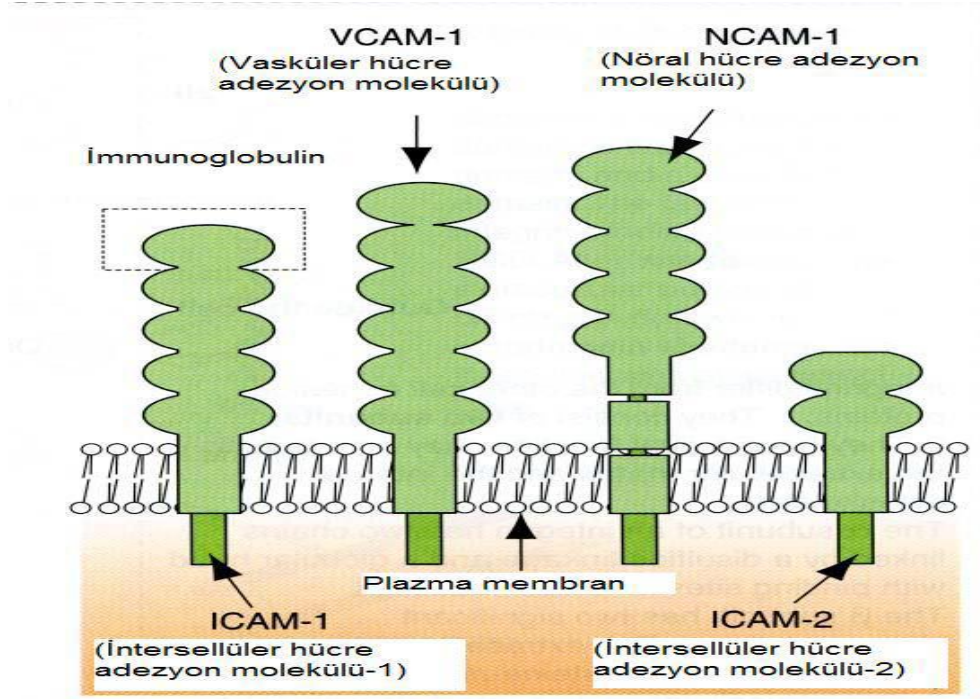
P-Selektin: İnflamasyonun gerçekleşmesinde ortaya çıkan ilk selektin molekülüdür. Endotelde sitokinler gibi uyarıların etkisi ile hücre yüzeyine doğru yer değiştirir (137).

3. Kaderinler

Yan yana yer alan hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlayan transmembran proteinlerdir. Yapı ve fonksiyonları bakımından kalsiyuma bağımlıdır (147,148).

4. İmmünglobulin Süper Ailesi

İmmünglobulin gen ailesinin üyeleri arasında, endotel hücrelerinde bulunan VCAM-1 ve ICAM-1 yer alır. Bunlar monositler ve lenfositler tarafından belirgin hale gelen transmembran proteinleridir. ICAM -1 endotel hücreleri tarafından, VCAM-1 ise PDGF gibi özel uyarılarla belirginleşir. İnsan aterogenezinde VCAM-1 ve ICAM-1 endotel hücreleri tarafından yapılırlar. VCAM-1 ve ICAM-1 moleküllerinin belirginleşmesi büyük olasılıkla monosit kemotaksisinin önemli bir komponentidir. Ayrıca VCAM-1, aterosklerozdaki immün reaksiyonunda da aktif olarak rol oynar (149) (Şekil 8).



Şekil 8. İmmünglobulin süper ailesi üyeleri adezyonu şematik gösteriliş

a) Hücreler arası Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1)

ICAM-1 birçok hücrede (endotel hücreleri, monositler, lenfositler vb) az miktarda bulunur. İnterlökin- 1, TNF- α , IFN-gama gibi sitokinleri etkisi ile artırılır. Oluşan bu artışın meydana geldiği alanlar ise akut ve kronik inflamasyonlardır. ICAM-1, LFA-1 (Leukocyte Function Associated antigen) ve makrofaj antijen-1 (Mac-1) ile birleşir. LFA-1 integrin ailesinden bütün lökositlerde, Mac-1 ise eozinofillerde, nötrofillerde ve monositlerde bulunur. Ekstraselüler kısmının proteolitik ayrılması ile ICAM-1'in solubl formu (sICAM-1) oluşur. ICAM-1'in serum düzeyleri birçok inflamatuvar, neoplastik ve bulaşıcı hastalıkta artmış oranda karşımıza çıkmaktadır. ICAM-2 ve ICAM-3 molekülleri ise LFA-1 için bağlanma görevini üstlenirler (150).

Uyarı sonucu, ICAM-1 molekülleri 2-4 saatte hücre yüzeyinde belirmeye başlar ve 12-16 saat süreyle devam eder. Ortamda sitokin olduğu zaman ise bu süre uzayarak 24-72 saat kadar devam eder. Eozinofiller, T lenfositler ve nötrofillerin göçünde ICAM-1 molekülleri önemli yer tutar (151). Antijen sunan hücreler ve T hücreleri arasındaki ilişkilerde sinyal mekanizmasının oluşumunda ICAM-1 görev almaktadır. ICAM-1'in bu fonksiyonu sonucu karşıt ligandı olan LFA-1 ile ilişkisi inflamatuvar hastalıkların çoğunda önemli yer tutar (152).

ICAM-2 (CD102) : ICAM-2 molekülü ICAM-1 den farklı olarak iki immunoglobulin benzeri domain bünyesinde barındırır. Mac-1 bağlanma bölgesi o domaini yapısında yer almadığından bulunmamaktadır (153). Endotel hücrelerinde, monositlerde ve lenfositlerde kendini gösterir. Buna karşın olarak proinflamatuvar sitokinler ekspresyonuna etki etmez (154).

ICAM-3 (CD50) : Endotel hücrelerinde yer almayıp sadece lökositlerde bulunur. T-lenfositlerin adezyonunda görev alır (154). ICAM-1 'e yapısal olarak çok benzer. Ancak ICAM-1'den tek farkı üçüncü immunoglobulin domainine Mac-1'in bağlanmamasıdır (153).

b) Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1)

İlk kez Osborn ve arkadaşları tarafından 1989'da tarif edilmiştir. Yaptıkları çalışma sonucunda VCAM-1'in endotel hasarının meydana gelmesinde etkin rol oynadığını ortaya koymuşlardır (154).

VCAM-1 molekülü altı ve yedi domainli olmak üzere iki formda bulunur. Bu iki form yapısal olarak birbirine benzer özellik gösterir. Ancak bu iki formun birbirinden tek farkı altı domainli formunda dördüncü immunoglobulin domainin

yer almamasıdır. Bu nedenle altı domainli formunda tek ligand bağlanma bölgesi birinci immünglobulin domainidir (153).

VCAM-1'in bulunduğu bölgeler arasında aktif endotel hücreleri, doku makrofajları, dendritik hücreleri ve kemik iliği fibroblastları yer alır. VCAM-1'in görevi, T lenfositlerin, monositlerin ve eozinofillerin endotel hücrelerine adezyonudur. Endotel hücrelerinde VCAM-1 ekspresyonunun vücutta belirgin olduğu alan kronik inflamasyon alanlarıdır (150).

Uyarılmamış endotelde yapısal olarak yer almaz. VCAM-1 sitokinlerin (interlökin-1, interlökin-4 ve TNF- α gibi) uyarısı ile 2-4 saat sonra hücre yüzeyinde belirgin hale gelir. VCAM-1'in seçici olarak belirgin hale gelmesinde İnterlökin-4 rol oynar. İnterlökin-4, VLA-4 (Very Late Antigen) vasıtasıyla eozinofillerin ortamda birikmesini sağlar (155).

Damar endotelial duvarında lökositlerin göçünü ve adezyonunu VCAM molekülleri sağlar (156). ICAM-1 ve VCAM-1 molekülleri immun yanıt ve iltihap durumlarında aktif rol oynarlar. VCAM-1 molekülü, çoğu hücre tipi tarafından eksprese edilebilen immünglobulin benzeri transmembran proteindir. VCAM 1'in bağlandığı karşı ligandı VLA-4'tür. VLA-4 nötrofiller hariç tüm lökositlerde bulunur. VCAM-1 / VLA-4 yolu, çeşitli alerjik, iltihap ve otoimmun hastalıklarının patojenik işlemlerinde aktif rol oynamaktadır (155).

3.6.2. Çeşitli Patolojilerde Hücre Adhezyon Moleküllerinin Rolü ve Tedavi Yaklaşımları

Romatoid artritte mononükleer hücreler, VLA-4 aracılığı ile sinoviyal hücrelerdeki VCAM-1 molekülüne tutunurlar ve bu tutunma sayesinde sinoviyal

sıvıya geçişleri engellenir. RA’da sinoviyal endotel hücrelerinde VCAM-1 molekülünün yer alması, bu hücrelerin aktif durumda olduğunu gösterir. Sistemik lupus eritematozuslu (SLE) olguların yapısal ve fonksiyonel değişikliğe uğramamış deri biyopsilerindeki damarlarda, adezyon moleküllerinin (E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi) artmış oranda eksprese edildikleri gösterilmiştir. SLE vaskülitlerinde serum ICAM-1 ve VLA-4 düzeyleri artmıştır. Wegener Granlomatozunda (WG), böbrekte nötrofil, lenfosit ve monositlerin birikiminde VCAM-1 ve ICAM-1 molekülleri rol oynar. WG’li olguların hastalık belirtilerinin söndüğü döneminde serum ICAM-1 aktivitesinin belirgin düştüğü, alevlenmelerde ise belirgin arttığı bildirilmiştir (157).

Hücre yüzeyinde bulunan adezyon moleküllerinin proteolitik ayrılması ile çözünür formları (solubl-s) oluşur. Örneğin SLE’li olgularda sVCAM-1, hastalığın klinik aktivasyonunu gösterir şekilde artış gösterirken, sICAM- 1 ve sE-Selektin düzeyleri normal seyir göstermektedir. WG’de sICAM-1 hastalık aktivitesini gösterir biçimde artan bir tablo ile karşımıza çıkar (158).

4.GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları ve Deneysel Çalışmasının Düzenlenmesi

Fırat Üniversitesi Deney hayvanları Çalışmaları Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra (Tarih: 06.02.2013, Toplantı: 1, Karar No: 14) çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Bu çalışmada ağırlıkları ortalama 200-220 gram arasında olan sekiz haftalık 35 adet Sprague-Dawley cinsi erkek 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. NASH oluşumu için % 70 oranında fruktoz kullanıldı (159).

Ratlar her bir grupta 7 rat olmak üzere beş gruba ayrıldı. Ratlara çalışma süresince standart rat diyeti, fruktoz ve *Tribulus terrestris* ekstratı oral olarak verildi.

Grup 1: Kontrol grubu. 8 hafta boyunca standart beslenme uygulandı.

Grup 2: Fruktoz ile NASH oluşturulan grup. 8 hafta boyunca standart beslenme ve %70 oranında fruktoz uygulandı.

Grup 3: NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* (TT) bitki ekstratı verilen grup. 8 hafta boyunca fruktoz ile eş zamanlı olarak *Tribulus terrestris* bitki ekstratı verildi.

Grup 4: NASH oluştuktan sonra (8 hafta sonunda), 6 hafta standart beslenme uygulanan grup.

Grup 5: NASH oluştuktan sonra (8 hafta sonunda), 6 hafta *Tribulus terrestris* bitki ekstratı verilen grup.

Deney süresi boyunca ratların ağırlıkları haftalık olarak ölçölüp kaydedildi. Deney sonunda (Grup 1, 2, 3 deney başlangıcından 8 hafta sonra, Grup 4 ve Grup 5 14 hafta sonra) tüm ratlar dekapite edildi ve çalışmanın sonuçlarının inceleneceğı parametreler için uygun kan ve doku örnekleri alındı.

4.2.Tedavi Protokolleri

Kontrol grubuna (Grup 1) ve fruktoz ile NASH oluşturulacak gruba (Grup 2) tedavi uygulanmadı. Grup 3'teki ratlara, fruktoz ile eşzamanlı olarak *Tribulus terrestris* ekstratı uygulamasına başlandı ve koruyucu rolü araştırıldı, Grup 4'teki ratlara NASH gelişim süresini takiben altı hafta boyunca standart beslenme uygulandı. Grup 5'teki ratlara ise NASH gelişim süresini takiben altı hafta süreyle *Tribulus terrestris* ekstratı verilerek tedavi edici etkileri araştırıldı.

4.3.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.

4.4. Laboratuvar ve Histopatolojik Analizler

4.4.1. Biyokimyasal İncelemeler

Biyokimyasal incelemeler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Kan örnekleri düz biyokimya tüplerine alındı, 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek serumları elde edildi. Ependorf tüplerine aktarılan bu serumlar -20 °C'de çalışma gününe kadar saklandı.

Örnekler çözdürüldükten sonra serum glukoz, AST, ALT, total kolesterol, trigliserit, HDL, LDL düzeyleri uygun kitler kullanılarak otoanalizörde ölçüldü.

Serum ICAM-1 düzeyleri rat ICAM-1 Elisa kiti (Boster, katalog no: EK0372) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı, 1:2 dilüsyon nedeniyle sonuçlar iki ile çarpıldı ve pg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: 2pg/ml, ölçüm aralığı: 31.2-2000 pg/ml'dir.

Serum VCAM-1 düzeyleri rat ICAM-1 Elisa kiti (Eastbiopharm, katalog no: CK-E30439) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı ve sonuçlar pg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: 0.018 ng/ml, ölçüm aralığı: 0.05-20 ng/ml, intra-assay Coefficient of variation (CV): < %10, inter-assay CV: < %12'dir.

Serum MMP-2 düzeyleri rat MMP-2 Elisa kiti (Boster, katalog no: EK0639) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı ve sonuçlar pg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: < 10pg/ml, ölçüm aralığı: 156-10.000 pg/ml'dir.

Serum MMP-9 düzeyleri rat MMP-9 Elisa kiti (Eastbiopharm, katalog no: CK-E30434) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı ve sonuçlar pg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi:

0.01 ng/ml, ölçüm aralığı: 0.05-10 ng/ml, intra-assay Coefficient of variation (CV): < %10, inter-assay CV: < %12'dir.

Serum NO düzeyleri rat NO Elisa kiti (Cayman chemical, katalog no:780001) kullanılarak ve kit kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 540-550 nm arasında alındı ve sonuçlar pg/ml olarak verildi.

Serum ADMA düzeyleri, Eureka marka rat ADMA ticari kiti kullanılarak HPLC cihazı ile kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışıldı.

4.4.2. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik inceleme için alınan doku örnekleri % 0,9'luk NaCl ile yıkanarak doku üzerindeki kan temizlendi. Hemen ardından zaman kaybedilmeden %35'lik formaldehit içerisinde korundu. Karaciğer kesitleri konvansiyonel histopatolojik inceleme öncesi parafin içerisinde fikse edildi, beş mikrometre kalınlığında kesitler alındı ve hemotoksilen eozin boyası ile boyandıktan sonra uzman bir patolog tarafından Olympus BX-51 ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Her bir karaciğer doku ve damar örneğinden 10 farklı alan x10, x40, x100 ve x200 büyütme ile incelendi.

4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplarda elde edilen veriler Ortalama±Standart sapma olarak verildi. Gruplardaki verilerin değerlendirilmesinde gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Bazal ve Haftalık Ağırlık Ölçümleri

Çalışma gruplarında rat ağırlıkları değerlendirildiğinde; bazal değerler açısından bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenirken, çalışma sonrasında grup 3'te diğer gruplara göre ağırlık açısından anlamlı bir şekilde azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Grup 1 ile grup 3 ve grup 3 ile grup 4 arasında anlamlı farklılık gözlenirken, grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 4).

Tablo 3. Gruplara Ait Rat Ağırlıkları

Gruplar	Ağırlıklar Bazal Değerler	Ağırlıklar Son Değerler	Ağırlıklar Arası Fark	P
Grup 1	303,42±25,79	382,42±36,23	79,00±14,30	0,018
Grup 2	309,71±19,37	346,14±20,93	36,42±9,37	0,018
Grup 3	299,00±15,49	274,83±48,42	35,14±31,65	0,249
Grup 4	308,85±23,03	387,57±37,89	78,71±28,22	0,018
Grup 5	280,85±34,88	337,71±46,96	56,85±28,61	0,018
P	0,18	P<0.01 grup 1-3 P<0.01 grup 3-4 P<0.05 grup 2-3		

Gruplar arasında rat ağırlıkları arasındaki ilişki tablo4'de verilmiştir.

5.2. Biyokimyasal Ölçümler

Tablo 4. Deney sonu serum karaciğer enzimleri, glukoz ve lipid parametreleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	P
Glukoz (mg/dl)	105.8±2.03	119.02±17.2	102.12±14.8	119.9±14.6	110.21±5.6	p<0.05 Grup 1-2 Grup 2-3 Grup 3-4
AST (U/L)	181.6±12.8	203.44±34.88	147.73±39.2	185.13±56.5	190.7±24.1	p<0.05 Grup1-2 Grup2-3 Grup 3-5
ALT (U/L)	60.4±4.8	65.4±1.7	61.29±4.6	66.29±6.4	73.14±3.1	p<0.05 Grup 1-2 Grup 1-5 Grup 2-3 Grup 2-5 Grup 3-5 Grup 4-5
T. Kolesterol (mg/dl)	73.57±12.7	93.85±12.1	67.42±13.4	71.85±15.7	73.85±9.3	p<0.05 Grup 1-2 Grup 2-3 Grup 2-5 Grup 2-4
Trigliserit (mg/dl)	57.57±8.6	88.0±17.1	72.42±10.1	66.0±10.4	90.0±15.2	p<0.05 Grup 1-2 Grup 1-3 Grup 2-3 Grup 1-5 Grup 3-5 Grup 4-5
HDL (mg/dl)	10.25±1.2	9.27±0.53	9.68±1.2	9.08±1.7	11.11±0.81	p<0.05 Grup 2-5 Grup 3-5 Grup 4-5
LDL (mg/dl)	11.51±2.2	13.21±0.6	11.02±3.39	11.8±1.7	14.11±4.4	p<0.05 Grup 2-3 Grup 3-5

Grup1:Kontrol, Grup2:Fruktoz+NASH, Grup3:NASH ile eş zamanlı+Tribulus

terrestris

Grup4:NASH+Standart Beslenme, Grup5:NASH oluşumu sonrası+Tribulus terrestris

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

Çalışmada gruplarda elde edilen serum açlık glukoz düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna göre (105.8 ± 2.03 mg/dl), NASH oluşturulan grup 2 (119.02 ± 17.2 mg/dl) ve NASH oluşturulduktan sonra standart beslenme verilmiş olan grup 4’de (119.9 ± 14.6 mg/dl) anlamlı olarak bir artış gözlemlendi ($P < 0.05$) (Tablo 5).

Tribulus terrestris ekstratı uygulanmış gruplardaki glukoz düzeylerinde ise NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı uygulanmış olan grup 3 (102.12 ± 14.8 mg/dl) ve NASH oluşturulduktan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı uygulanmış grup 5’de (110.21 ± 5.6 mg/dl) NASH oluşturulan grup 2’ye göre azalmalar gözlenmekle beraber, sadece grup 3 deki azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermekteydi ($P < 0.05$). Grup 3 ise NASH oluşturulduktan sonra standart beslenme uygulanmış olan grup 4’e (119.9 ± 14.6 mg/dl) göre anlamlı olarak ($p < 0.05$) düşük tespit edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5’de gösterildiği gibi karaciğer fonksiyon testlerinden olan serum AST düzeyleri açısından kontrol grubuna göre (181.6 ± 12.8 U/L), NASH oluşturulan grup 2 (203.44 ± 34.88 U/L) ve NASH oluşturulduktan sonra standart beslenme verilmiş olan grup 4’de (185.13 ± 56.5 U/L) anlamlı olarak bir artış gözlemlendi ($P < 0.05$) (Tablo 5). NASH oluşturulan grup 2’ye göre, NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı uygulanmış olan grup 3’de (147.73 ± 39.2 U/L) anlamlı bir azalma gözlemlendi ($P < 0.05$). Ancak NASH oluşturulduktan sonra

Tribulus terrestris ekstratı uygulanmış grup 5 (190.7 ± 24.1 U/L) ise grup 2 ye göre bir düşüş göstermekle beraber, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P > 0.05$). Grup 5, grup 3' göre anlamlı artış göstermekteydi ($P > 0.05$) (Tablo 5).

Serum ALT düzeyleri NASH oluşturulan grup 2'de (65.4 ± 1.7 U/L), kontrol grubuna göre (60.4 ± 4.8 U/L) hafif bir artış göstermekle beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P > 0.05$) (Tablo 5).

Tribulus terrestris ekstratı uygulanmış gruplardaki ALT düzeylerinde ise NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı uygulanmış olan grup 3 (61.29 ± 4.6 U/L) de NASH oluşturulan grup 2'ye göre hafif bir düşüş vardı ama bu düşüş anlamlı değildi ($P > 0.05$). NASH oluşturulduktan sonra standart beslenme uygulanmış grup 4 (66.29 ± 6.4 U/L) ve *Tribulus terrestris* ekstratı uygulanmış grup 5 (73.14 ± 3.1 U/L) de ise hem kontrol grubuna göre hem de NASH oluşturulmuş grup 2 ye göre artışlar olmakla beraber sadece grup 5 de, grup 1, 2 ve 3 e göre anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$) (Tablo 5).

Serum total kolesterol düzeyleri; grup 2'de (93.85 ± 12.21 mg/dl); grup 1 (73.57 ± 12.7 mg/dl), grup 3 (67.42 ± 13.4 mg/dl), grup 4 (71.85 ± 15.7 mg/dl) ve grup 5'e (73.85 ± 9.3 mg/dl) göre anlamlı olarak ($p < 0.05$) yüksek bulundu. Grup 3 ise diğer gruplara oranla düşük olmakla beraber grup 2 hariç diğer gruplara göre anlamlı değildi ($p < 0.05$) (Tablo 5).

Serum trigliserid düzeyleri; grup 2 (88.0 ± 17.1 mg/dl); kontrol grubuna (57.57 ± 8.6 mg/dl) ve NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grup 3'e (72.42 ± 10.1 mg/dl) göre anlamlı olarak ($p < 0.05$) yüksek bulundu. Kontrol grubu; grup 3'e göre anlamlı olarak ($p < 0.05$) düşük iken NASH oluşturulduktan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grup 5 (90.0 ± 15.2

mg/dl) göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi($p<0.05$). NASH oluşturulduktan sonra standart beslenme uygulanan grup 4 (66.0 ± 10.4 mg/dl) ise grup 5' göre anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük bulundu (Tablo 5).

Serum HDL kolesterol düzeyleri; NASH oluşturulan grup 2 (9.27 ± 0.53 mg/dl), NASH oluşturulduktan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grup 5 (11.11 ± 0.81 mg/dl) göre anlamlı olarak düşük tespit edildi($p<0.05$). NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grup 3, NASH oluşturulan grup 2'ye göre yüksek olmakla beraber anlamlı değil iken grup 5'e göre de yüksek olmasına rağmen anlamlılık göstermekteydi($p<0.05$). NASH oluşturulduktan sonra standart beslenme uygulanan grup 4 (9.08 ± 1.7 mg/dl) ise grup 5'e göre anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük bulundu (Tablo 5) .

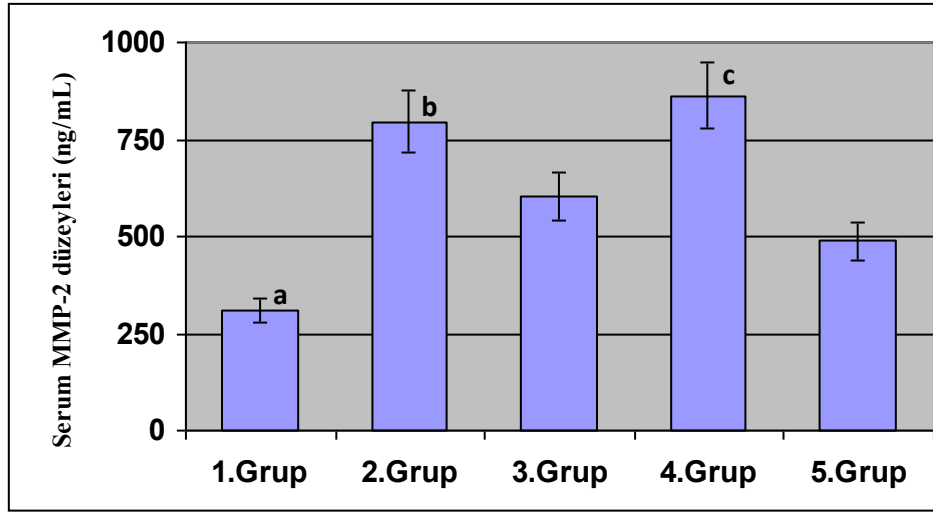
Serum LDL kolesterol düzeyleri; grup 2'de (13.21 ± 0.6 mg/dl), grup 1'e (11.51 ± 2.2 mg/dl) göre bir artış olmakla beraber bu artış anlamlı değildi ($p<0.05$). Fakat grup 3'de (11.02 ± 3.39 mg/dl) grup 2'ye göre anlamlı bir düşüş göstermektedir($p<0.05$). Grup 5 (14.11 ± 4.4 mg/dl) ise grup 3'e göre anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek bulundu (Tablo 5).

Çalışmada ölçülen spesifik parametreler ile ilgili olarak yapılan ölçümler sonrasında ise aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

5.2.2. Serum MMP-2 Düzeyleri

Serum MMP-2 düzeyleri; kontrol grubu (308.28 ± 113.9 pg/ml) bütün gruplara oranla anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı verilen grup 3 (602.42 ± 125.09 pg/ml) ve NASH oluşturulduktan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verilen grup 5 (489.42 ± 199.91

pg/ml) ise grup 2'ye kıyasla anlamlı olarak azalma göstermekle beraber ($P<0.05$) yine de kontrol grubuna göre yüksekti. Ayrıca NASH oluşumu sonrasında standart beslenme yapılan grupta da (862.42 ± 178.3 pg/ml) diğer gruplara kıyasla MMP-2 değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0.05$) (Şekil 9).

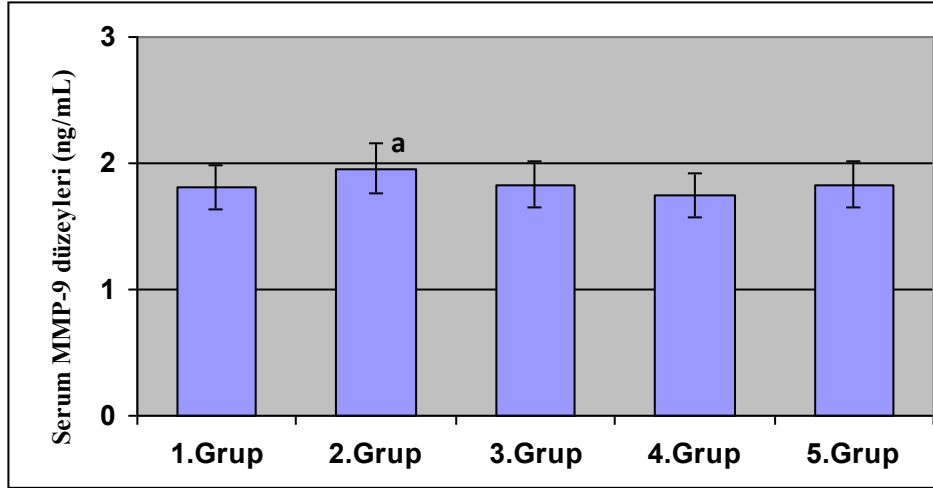


Şekil 9. Çalışma gruplarında elde edilen Serum MMP-2 düzeyleri

(a: $P<0.05$: Grup 1-Grup2,3,4,5, b: $P<0.05$ Grup2-Grup 3,5, c: Grup 4-Grup 3,5)

5.2.3. Serum MMP-9 Düzeyleri

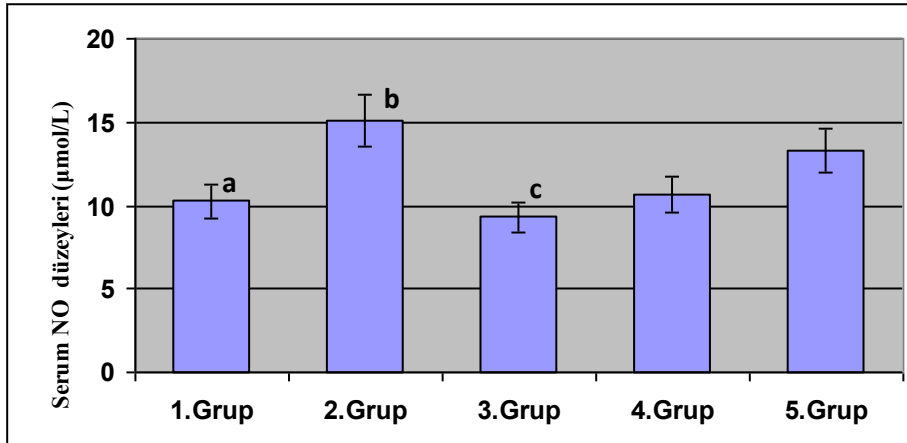
Serum MMP-9 düzeyleri; grup 2 (1.96 ± 0.07 ng/ml) bütün gruplara göre yüksek olmakla beraber sadece kontrol grubuna (1.81 ± 0.11 ng/ml), NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstre verdiğimiz grup 3 (1.83 ± 0.13 ng/ml) ve NASH oluşturulduktan sonra *Tribulus terrestris* ekstre verdiğimiz grup 5'e (1.83 ± 0.35 ng/ml) göre bu artış anlamlılık göstermekteydi ($p<0.05$). NASH oluşturulan grup 2 ise NASH oluşturulduktan sonra standart beslenme uygulanan grup 4'e (1.74 ± 0.16 ng/ml) oranla anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek bulundu (Şekil 10).



Şekil 10. Çalışma gruplarında elde edilen Serum MMP-9 düzeyleri (a: $P<0.05$ Grup 2- Grup 1,3,4)

5.2.4. Serum NO Düzeyleri

Serum NO düzeyleri; grup 2’de ($15.09 \pm 4.75 \mu\text{mol/L}$) grup 1 ($10.25 \pm 3.57 \mu\text{mol/L}$), grup 3 ($9.33 \pm 1.06 \mu\text{mol/L}$) ve grup 4’e ($10.71 \pm 2.84 \mu\text{mol/L}$) göre anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek bulundu. Grup 5’de ise ($13.38 \pm 2.48 \mu\text{mol/L}$) grup 3’e göre anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek tespit edildi (Şekil 11).

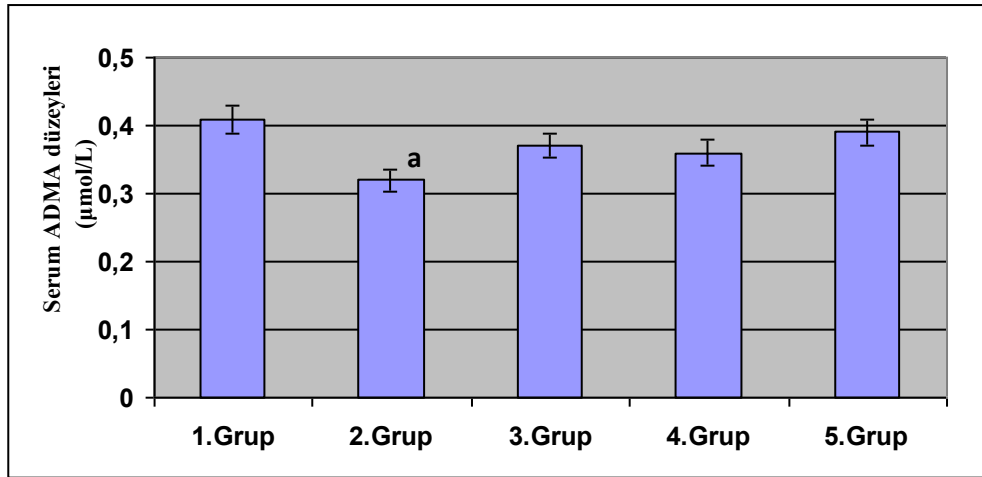


Şekil 11. Çalışma gruplarında elde edilen Serum NO düzeyleri

(a: $P<0.05$ Grup 1-Grup 2,5, b: $P<0.05$ Grup 2-Grup 3,4, c: $P<0.05$ Grup 3-5)

5.2.5. Serum ADMA Düzeyleri

Serum ADMA düzeyleri; kontrol grubu ($0.43 \pm 0.09 \mu\text{mol/L}$), NASH oluşturulan grup 2'ye ($0.32 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$) göre anlamlı olarak ($p < 0.05$) yüksek bulundu. Grup 2 ise NASH oluşturulduktan sonra *Tribulus terrestris* ekstrası verdiğimiz grup 5'e ($0.39 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$) göre anlamlı olarak ($p < 0.05$) düşük tespit edildi. Kontrol grubu, grup 3 ($0.37 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$) ve grup 4'e ($0.36 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$) göre yüksek olmakla beraber anlamlı değildi ($P < 0.05$) (Şekil 12).

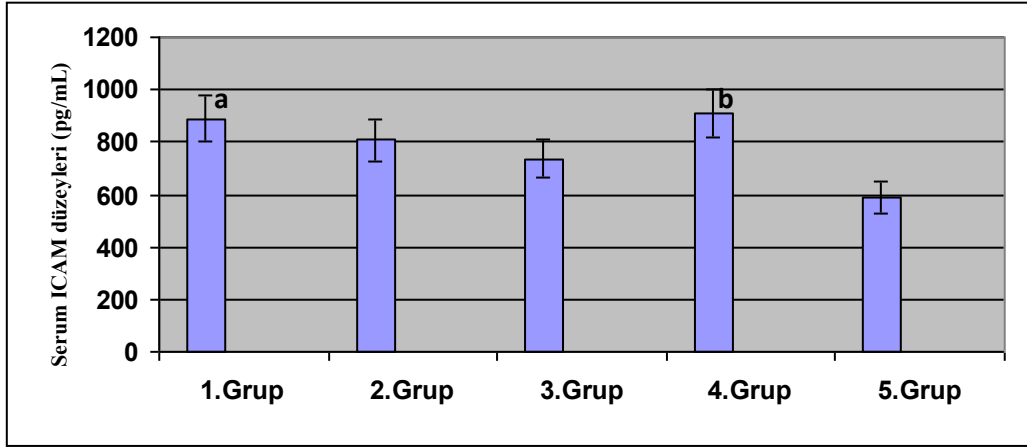


Şekil 12. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ADMA düzeyleri.

(a: $P < 0.05$ Grup 2-Grup 1,5)

5.2.6. Serum ICAM-1 Düzeyleri

Serum ICAM-1 düzeyleri; grup 5 ($589.1 \pm 174.9 \text{ pg/ml}$); grup 1 ($889.89 \pm 200.4 \text{ pg/ml}$) ve grup 4'e ($908.85 \pm 89.5 \text{ pg/ml}$) göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$). Grup 3 ($735.99 \pm 116.4 \text{ pg/ml}$) grup 4'e ($908.85 \pm 89.5 \text{ pg/ml}$) göre anlamlı olarak düşük iken grup 4 de grup 5'e göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 13).

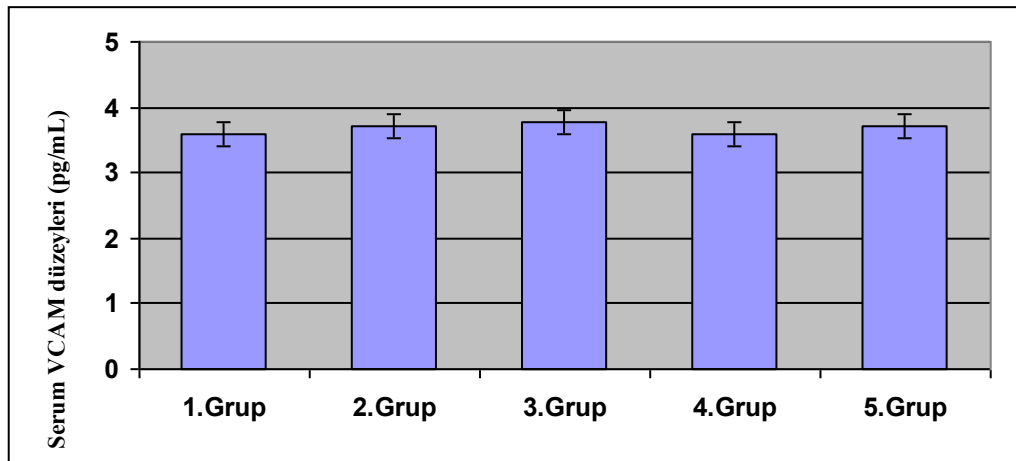


Şekil 13. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ICAM-1 düzeyleri

(a: $P < 0.05$ Grup 1-Grup 5, b: $P < 0.05$ Grup 4,5)

5.2.7. Serum VCAM-1 Düzeyleri

Serum VCAM-1 düzeyleri; grup 1’de (3.6 ± 0.4 ng/ml), grup 2’de (3.72 ± 0.6 ng/ml), grup 3’de (3.78 ± 0.6 ng/ml), grup 4’de (3.61 ± 0.6 ng/ml) ve grup 5 de (3.79 ± 0.7 ng/ml) olarak ölçüldü. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Çalışma gruplarında elde edilen Serum VCAM-1 düzeyleri

($P > 0.05$)

5.3. Histopatolojik İnceleme Bulguları

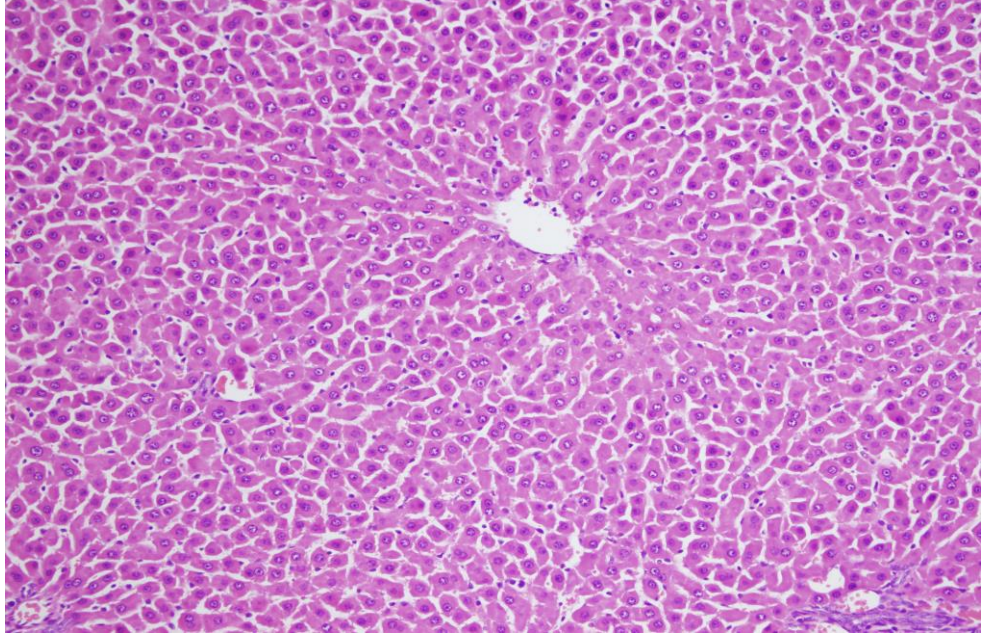
Ratların karaciğer dokularından ve damarlarından hazırlanan ve hemotoksilen eozin boyası ile boyanan histolojik preparatların incelenmesi sonucu kontrol gruplarında normal karaciğer doku histolojisi bulguları olduğu tespit edilmiştir.

Fruktoz kullanılan tüm gruplarda steatozis nekroinflamatuvar aktivitede artış gözlenmiştir. *Tribulus terrestris* bitki ekstraktı verilmesiyle steatoz ve nekroinflamatuvar aktivitede azalma gözlenmemiştir.

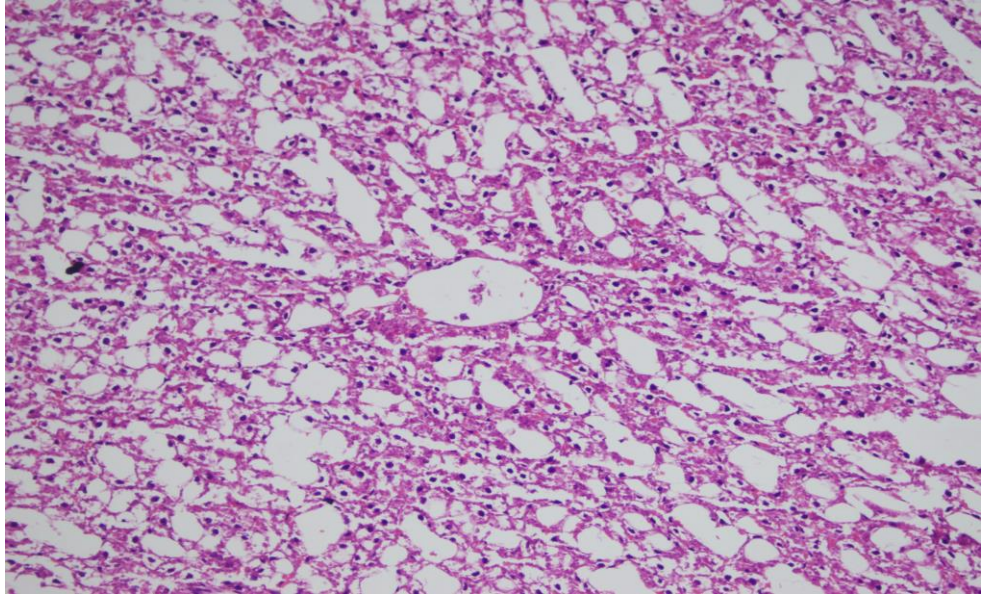
Steatoz karaciğer hücrelerinin yağ içeriğinin normal karaciğer hücrelerinininkine oranlanmasına dayanan aşağıdaki şekilde % 33'in altında 1, % 33-66 aralığında 2, % 66 üzerinde 3 olarak değerlendirilmiştir. Nekroz mm²'deki odak sayısı ve inflamasyon mm²'deki inflamatuvar hücre sayısı ile tayin edilmiştir. Fibrozis karaciğer dokusuna fibroz alanlarının oranlanmasıyla değerlendirilmiştir (160) (Tablo 6).

Tablo 5. Steatoz gelişmiş karaciğer hücrelerinin yağ içeriğinin normal karaciğer hücrelerinininkine oranlanması

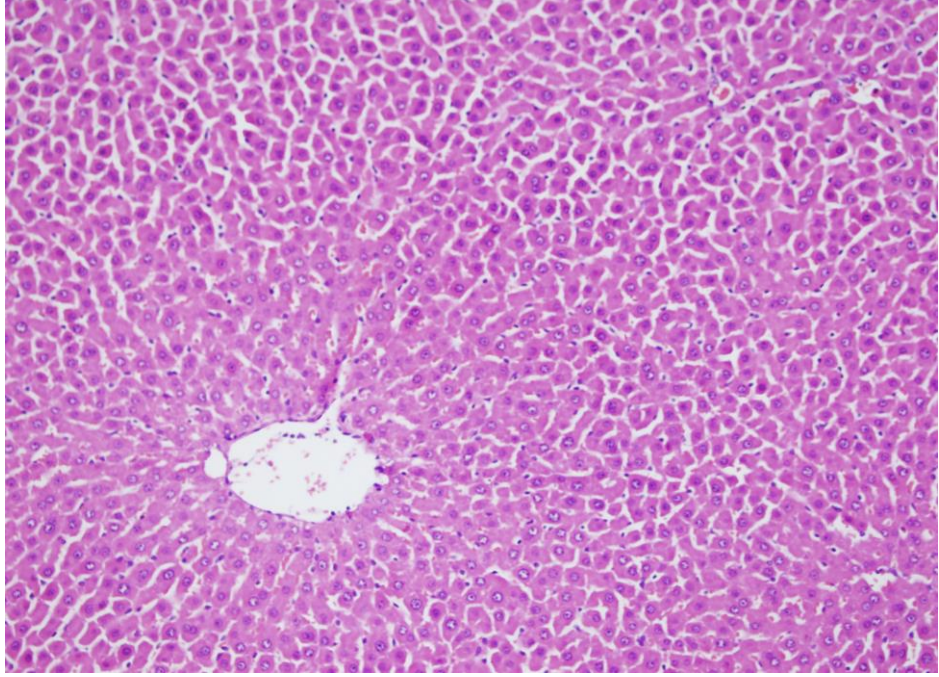
Gruplar	Yağlanma	Nekroz mm ² 'deki odak sayısı	İnflamasyon mm ² 'deki inflamatuvar hücre sayısı	Fibrozis
Grup1-1	1	0	0	-
Grup1-2	1	0	0	-
Grup1-3	1	0	0	-
Grup1-4	1	0	0	-
Grup1-5	1	0	0	-
Grup1-6	1	0	0	-
Grup1-7	1	0	0	-
Grup2-1	3	4	6	-
Grup2-2	4	4	6	-
Grup2-3	2	4	4	-
Grup2-4	4	4	6	-
Grup2-5	3	4	6	-
Grup2-6	3	4	4	-
Grup2-7	2	4	6	-
Grup3-1	1	0	0	-
Grup3-2	1	2	2	-
Grup3-3	1	1	2	-
Grup3-4	1	1	2	-
Grup3-5	1	1	4	-
Grup3-6	1	1	2	-
Grup3-7	1	1	2	-
Grup4-1	2	2	3	-
Grup4-2	3	2	2	-
Grup4-3	2	1	4	-
Grup4-4	2	4	3	-
Grup4-5	2	2	3	-
Grup4-6	1	1	4	-
Grup4-7	2	2	2	-
Grup5-1	2	1	3	-
Grup5-2	1	2	1	-
Grup5-3	3	2	2	-
Grup5-4	2	4	1	-
Grup5-5	1	2	3	-
Grup5-6	3	1	2	-
Grup5-7	2	2	2	-



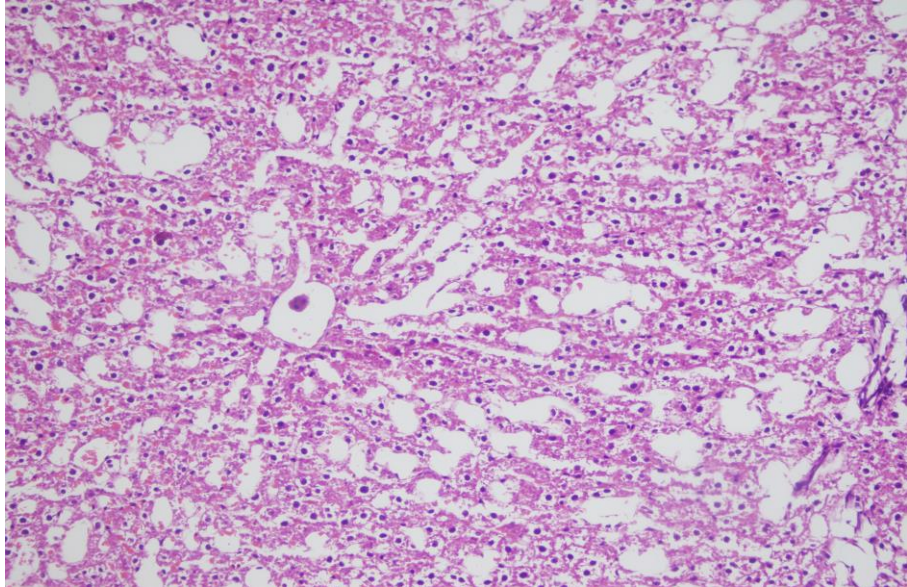
Şekil 15. Kontrol grubu ratlara ait karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü (H.E. X 100)



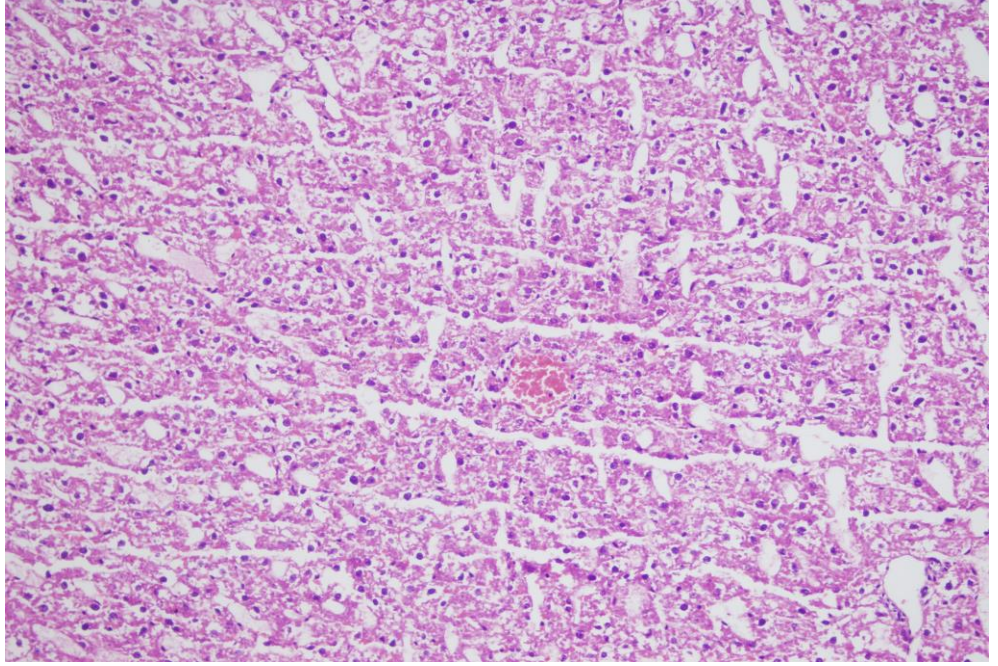
Şekil 16. Fruktoz ile NASH oluşturulan grup ratlara ait karaciğer dokusunda orta düzeyde artmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü (H.E. X 100)



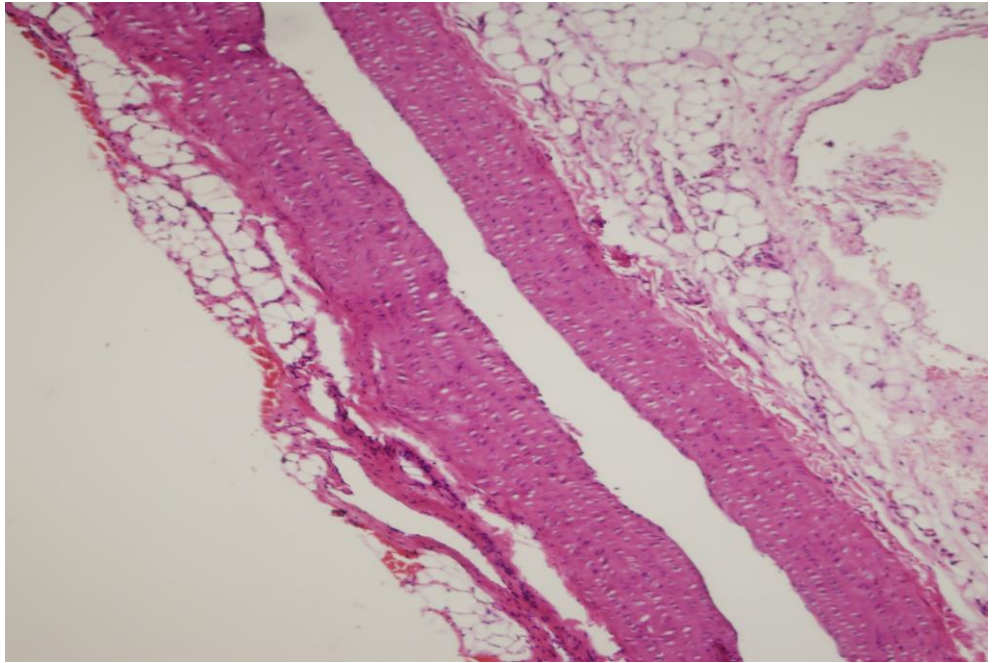
Şekil 17. NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* verilen grup ratlara ait karaciğer dokusunda azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü (H.E. X 100)



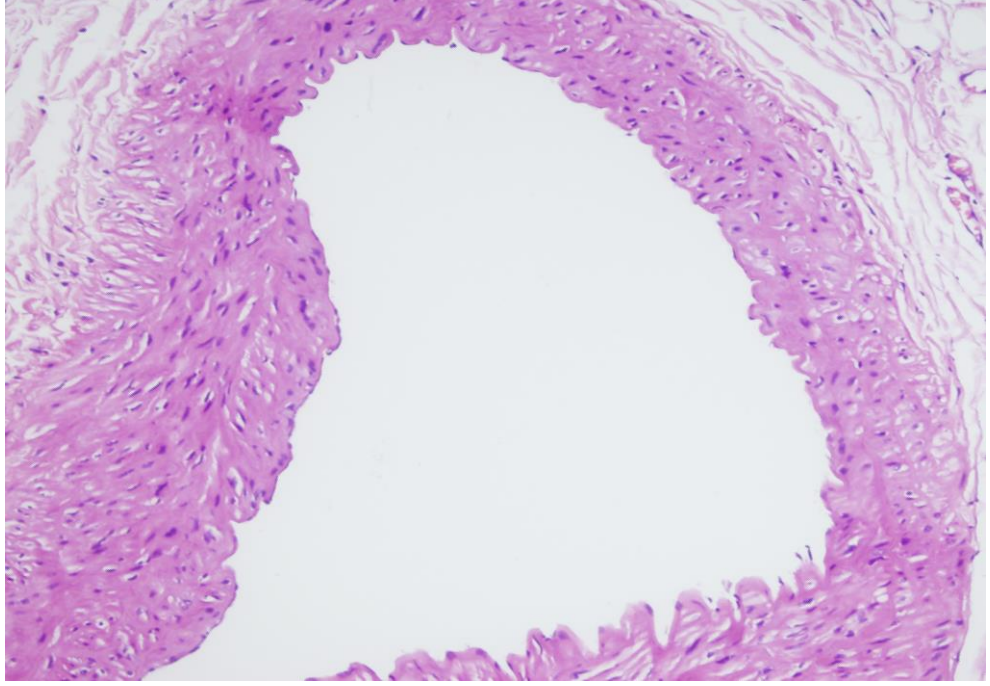
Şekil 18. NASH oluştuktan sonra standart beslenme uygulanan grup ratlara ait karaciğer dokusunda azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü (H.E. X 100)



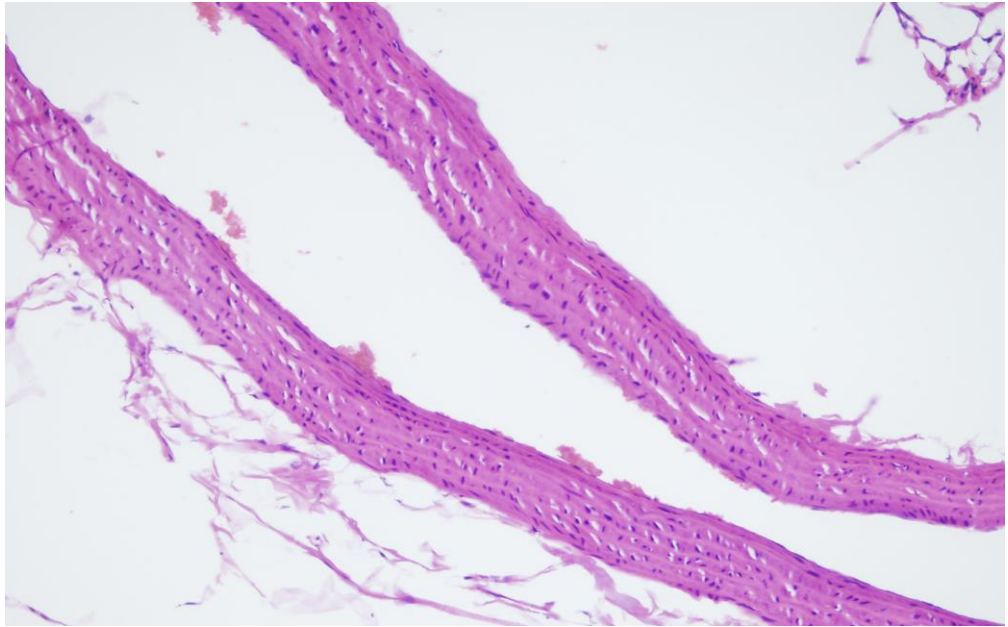
Şekil 19. NASH oluştuktan sonra *Tribulus terrestris* verilen grup ratlara ait karaciğer dokusunda azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histolojik görünümü (H.E. X 100)



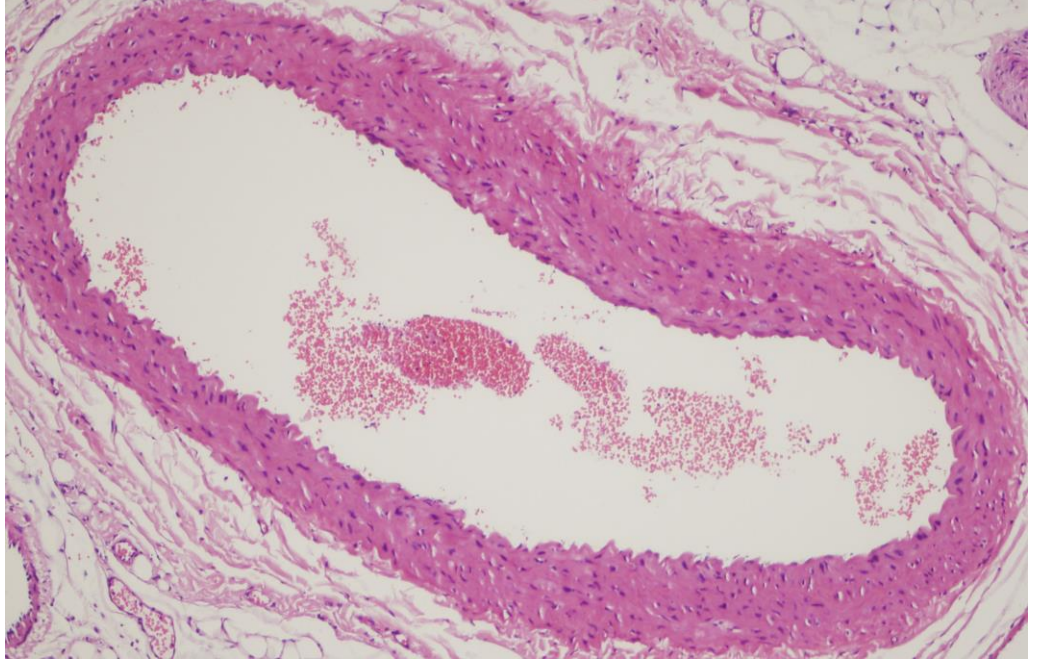
Şekil 20. Kontrol grubu ratlara ait damarın normal histolojik görünümü (H.E. X 100)



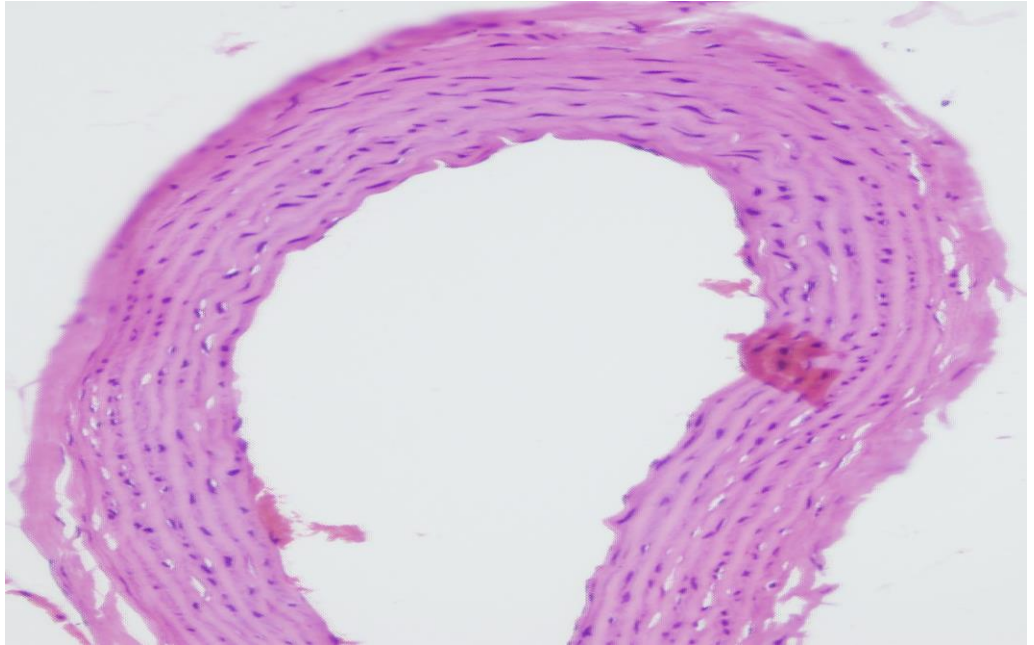
Şekil 21. Fruktoz ile NASH oluşturulan grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü (H.E. X 100)



Şekil 22. NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* verilen grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü (H.E. X 100)



Şekil 23. NASH oluştuktan sonra standart beslenme uygulanan grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü (H.E. X 100)



Şekil 24. NASH oluştuktan sonra *Tribulus terrestris* verilen grup ratlara ait damarın normal histolojik görünümü (H.E. X 100)

6.TARTIşMA

Son yıllarda giderek sanayisi artan ÷lkelerde kronik viral hepatit ve alkolik hepatitin yanında nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı en sık gör÷len karaciğer hastalığı olmuştur (10). NAYKH alkol alımı olmadan basit steatozisten NASH'e kadar değişen bir periyodik tabloya sahiptir (5,161). Nonalkolik yağlı karaciğer daha çok benign olarak kabul edilir. NASH'in % 15 oranında siroza kadar ilerleme gösterdiği bildirilmektedir. NASH lobuler inflamatuvar hücre infiltrasyonu makrovezik÷ler steatozis hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu nekroz, Mallory cisimciğı ve presinuzoidal fibrozise kadar değişkenlik gösteren geniş histopatolojik bir yelpazeye sahiptir (161,162).

Gelişmiş toplumlarda obezitenin ve aşırı kiloluların yayılma hızındaki artışla beraber NASH'in daha sık karşılaşılan bir hastalık olarak karşımıza çıkacağı kaçınılmaz bir gerçektir. Günümüzde NASH'in meydana gelmesinde öne sür÷len patojenik hipotezler ins÷lin rezistansını, oksidatif stresi ve pro-inflamatuvar sitokinlerin anormal üretimini kapsamaktadır. Bu durum toplumda metabolik sendrom tip 2 Diabetes Mellitus ve kardiyovask÷ler gibi hastalıkların patogenezi ile benzerlik göstermektedir (23,163).

Gaithi ve arkadaşları ise Can ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak 60 mg/kg streptozotocin ile deneysel diyabet oluşturdukları çalışmalarında serum ALT düzeylerindeki artışı $p<0.05$ seviyesinde saptamışlardır (164). Kusunoki ve arkadaşları karaciğer bozukluğunun belirteci olan ALT ve AST değerlerinin yaptıkları çalışma sonucunda diyabetli ratlarda normal ratlara oranla yükselmiş olduğunu tespit etmişlerdir (165).

E vitamini ürik asit ve diyet kompozisyonunun NAYKH'ın histopatolojisine etkileri ile ilgili yapılan bir çalışmada ise E vitamininin karaciğer yağlanmasını azalttığını NAYKH'nın hafif formları ile NASH karşılaştırıldığında ürit asitin NASH'li hastalarda arttığını ortaya koymuşlardır (166). Antioksidan eksikliği nedeniyle lipid peroksidasyonunun artması hücre ölümüne yol açabileceğinden dolayı E vitamininin NAYKH de tedavi etkisinin olabileceği test edilmiştir (167,168). E vitaminin ALT, AST, steatoz ve lobüler inflamasyon ile ilişkili olup hepatositlerde koruyucu bir rolü olduğu düşünülmektedir (169).

Kronik karaciğer hastalıklarının çok unsurlu patogenezinde vitamin E maddesinin NAFLD, NASH ve kronik hepatit C gibi hastalıkların tedavisinde başka ilaçlarla karıştırılarak önemli bir şekilde nasıl bir etkiye sahip olduğu araştırılmaktadır (170,171). Örneğin NASH'in tedavisi sırasında vitamin E ve ursodeoksikolik asit ilacının bir arada kullanılması uzun dönem karaciğer fonksiyonlarının testinde etkili sonuçlar göstermiştir (170). Bir diğer çalışmada ise vitamin E ve ursodeoksikolik asidin birleşimi hepatosellüler apoptozda bir düşüşün yaşanmasına ve aynı zamanda AST ve ALT değerleri üzerinde anlamlı etkiler göstermiştir (172).

Biz de çalışmamızda NASH ile ilgili bulguların elde edilmesinde vitamin E, ürik asit gibi maddelerin yanı sıra bitkisel bir ilaç olan *Tribulus terrestris*'i kullandık.

Tribulus terrestris yaygın olarak nerunjil diye bilinen bu bitki aynı zamanda Akdeniz bölgesinin yaygın ve çok yıllık bir bitki türü olup, Hindsitan, Çin, Bulgaristan, Güney Afrika gibi ülkelerde cinsel iktidarsızlık abdominal şişkinlik, ödem gibi rahatsızlıkların tedavisinde halk ilacı olarak kullanılır (Sharifi

et al., 2003) (58). Li ve arkadaşları Nerunjilden olan saponinlerin belirgin hipoglisemik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir (61).

Bizim çalışmamızda da grup 4’de; kontrol grubuna ve *Tribulus terrestris* ekstratı uygulanan gruplara göre serum AST düzeyleri anlamlı olarak ($p<0.01$) yüksek tespit edildi. *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grupta AST düzeylerinde kontrol grubuna göre düşüş tespit edilmiş olup bu da bitkinin koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Serum ALT düzeyleri NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratını verdiğimiz grupta (Grup 3) kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edilmiştir. NASH oluşumundan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verilen grupta (Grup 5) ise kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla anlamlı olarak ($p<0.01$) yüksek tespit edilmiştir. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının patogeneğinde var olan çift darbe hipotezine göre yağlanma ile sonuçlanan birinci darbede anahtar rolü insülin direnci üstlenmektedir. Birinci darbede insülin direnci hepatositlerde yağ birikimine yol açar. İkinci darbede ise lipid peroksidasyonu üretimini gerçekleştirir. Artan lipid peroksidasyonu da karaciğer hasarının ilerlemesine neden olur. Bu da bize kullandığımız bitkinin NASH oluşumu sırasında lipid peroksidasyonunu engelleyerek hastalığının oluşumu esnasında koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

Amin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda *Tribulus terrestris* ile tedavi sonrası ALT düzeylerinde azalma görülmüş ve bu sonucun bitkinin koruyucu etkisini olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Aynı etkinin AST düzeylerinde de azalma olduğunu söylemişlerdir. Bu sonuçlara bağlı olarak *Tribulus terrestris* bitkisinin hepatoprotektif etkilere

sahip olduğunu gösterdiklerini dile getirmişlerdir. Streptozotoksindeki hipoinsülin uyarılmış diyabetik ratlarda koenzim-A oksidasyonunu başlatıp lipid peroksizom aktivitesini arttırır. Artan lipid peroksizom zar akışkanlığını azaltarak ve zara bağlı enzim ve reseptörlerin aktivitesini değiştirerek zar fonksiyonunu bozar. Lipid radikal ve lipid peroksit vücuttaki çoğu hücreye zarar verir ve beyin hasarı ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (66).

Li ve arkadaşlarının 10 mg/kg/gün sulu Tribulus ekstraktı kullanılarak gerçekleştirdikleri çalışmada kobay hayvanlarda kontrol ile karşılaştırıldığında antihipertensif etkiler göstermiştir (61). Yine aynı araştırma grubunun sağlıklı kobay farelerini kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada tribulusun glukoneojenezisi belirgin şekilde düşürdüğü, glikometabolizmi etkilediği, trigliserid seviyesini düşürdüğü ve toplam kolesterol seviyesini aşağı çekmiştir. Tribulustan izole edilen sapanin bileşikler ile peristaltik hareketlerde belirgin bir düşüşe neden olan doza bağlı antispazmatik aktivite elde edilmiştir (62). Hong ve arkadaşlarının çalışmasında ise COX-2 inhibisyon aktivitesi belirlenmiş, antinflamatuar olarak kullanımı önerilmiştir (63).

Grigороva ve arkadaşlarının (2008a) 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(67). Yaptıkları bir diğer çalışmada ise bitki verilen grupta serum glukoz düzeyinin kontrol grubuna göre önemli derecede düştüğünü ifade etmişlerdir (67,68).

Yapılan bir çalışmada da diyabetik sıçanların 8 haftalık vücut ağırlığının ölçümü esnasında vücut ağırlığının ve açlık kan şekerinin nerunjil etkisi tedavi

grupları arasında önemli farklılıklar göstermediğini kanıtlamıştır. Streptozotosinin yönetimi tüm gruplarda glukoz düzeyini önemli derecede arttırmıştır. Tedaviler büyük ölçüde plazma glukoz derecesini azaltmıştır. İnsülin tedavisi işlenmiş streptozotosin sıçanlarıyla karşılaştırıldığında plazma glukozunu önemli derecede azaltmıştır. Tek başına insülinle tedavi edilen sıçanlarla karşılaştırıldığında pregabalin ve nerunjil insülin karışımı plazma glukoz değerlerini çok da etkilememiştir. Ancak tek başına insülin ile tedavi edilen sıçanlarla karşılaştırıldığında nerunjil insülin kullanımı plazma glukoz değerlerini önemli ölçüde azaltmıştır (173).

Yine bizim çalışmamız da *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz gruplarda serum glukoz ve serum total kolesterol düzeyleri kontrol grubuna göre düşük tespit edilmiştir. Yağ asidi metabolizmasında bozulma olduğunda karaciğer de yağ depolanabilir. Buna bağlı olarak da karaciğer hücrelerinde değişimler oluşur. Glukoz kullanıldığında yağ dokusundaki trigliseritler serbest yağ asitlerine yıkılırlar seruma geçerek karaciğere ulaşır ve burada enerji için kullanılırlar. Fakat glukoz kullanılmadığında yağ dokusundaki trigliseritler serbest yağ asitlerine yıkılmazlar ve karaciğerde yağlanmaya neden olurlar. Yağlanmanın oluşumu sırasında kullandığımız bitkinin hastalığının seyrinin değişmesinde olumlu etki yapıp koruyucu etki gösterdiğini ama NASH oluşuktan sonra tedavi etkisinin olmadığını düşünmekteyiz.

Diabetes Mellitusda lipid metabolizmasına bakıldığında trigliserid total kolesterol, HDL, LDL ve VLDL seviyelerinde meydana gelen değişim dikkat çekmektedir. Plazma kolesterolündeki artışın dokularda oluşan lipid metabolizmasındaki farklılıkların bir sonucu olarak veya genel olarak plazma

lipid profilinde meydana gelen herhangi bir değişiklikten sorumlu olan enzim aktiviteleri lipoprotein lipaz ve hepatik lipaz enzim aktiviteleridir. Lipoprotein fraksiyonları içerisinde en aterojenik olan LDL'dir. Serum trigliserid düzeyi artışıında oluşan LDL'nin dansitesi artar ve çapı küçölür. HDL ise aterosikloroza karşı koruyucu lipoprotein fraksiyonu olarak ele alınmaktadır. HDL yapımında kullanılan hepatik trigliserid lipaz enzimi HDL içinde bulunan trigliseridleri hidrolize eder. Lipoprotein lipaz aktivitesini artıran insölün hepatik trigliserid lipaz aktivitesini de arttırır. İnsölün yetmezliğinde serum VLDL miktarı artış gösterirken HDL miktarında da azalma görölmekte ve diyabetik hastaların bir çoğunda HDL seviyelerinin düştüğü ve bu nedenle LDL/HDL oranının Diabetes Mellitusda önemli derecede yükseldiği bilinmektedir.

Bizim alışmamızda LDL düzeyleri; NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grupta (Grup 3) kontrol gurubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edilmiştir. NASH oluşumundan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verilen grupta (Grup 5) ise kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla anlamlı olarak ($p<0.01$) yüksek tespit edilmiştir. HDL düzeyleri ve tigliserit düzeyleri kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı olarak ($p<0.01$) yüksek tespit edilmiştir.

Tuncer ve arkadaşları 18 Yeni Zelanda tavşanı üzerine yaptıkları çalışmalarında *Tribulus terrestris* ekstratı verilen gruplarda HDL, LDL ve trigliserit seviyelerinin kontrol grubuna oranla önemli derecede azaldığını belirtmişlerdir (59).

Literatürde oksidatif stresin endotel disfonksiyonu oluşumunda etkili olduğunu kanıtlayan birçok çalışma vardır. Endotel disfonksiyonuna neden olan

sistemik süreçlerinin birçoğu hücre oksidatif sinyal aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Buna eşlik eden olgular ise; LDL oksidasyonu NO salımının azalması ve vasküler inflamatuvar gen ekspresyonudur (174,175). Endojen NO'nın vazorelaksan etkisine vazokonstriktif maddelerin üstün gelmesi sonucunda dinamik endotel bağımlı vazodilatasyon bozukluğu oluşmakta ve bu bozukluk endotel disfonksiyonunun temelini oluşturmaktadır (174). NAYKH'da karaciğer hasarının meydana gelmesinin nedeni olarak düşünülen oksidatif stresin endotel fonksiyonlarının bozulmasına da katkı sağladığı düşünülmektedir (176).

Yapılan bir başka çalışmada oksidatif stresin nitrik oksit ve glutatyon serum dozlarında artışları yine NASH hastalarının süperoksit dismutaz ve antioksidan durumlarında azalmaları kanıtlanmıştır (Koruk et al., 2004). Bu sonuçlar NASH'in ilerlemesinde NO ve nitrotirosinin içermesi ikinci darbe olarak kanıtlanmıştır. Bununla birlikte karaciğerin fibrozis ve steatosis gelişiminde NO ve nitrotirosinin oluşumu tam olarak açıklanamamıştır. Bunun sebebi ise kullanılan hayvan modellerindeki detaylı deney eksikliği yüzündendir (177). Çok önemli bir araştırma karaciğer rahatsızlığı ve NO arasında bir ilişkinin olduğu üzerine yoğunlaşmıştır. INOS'tan türeyen büyük miktardaki NO'ların karaciğer rahatsızlığında sağlığa zararlı etkileri olduğu görülmüştür (178).

Bizim de çalışmamızda NO düzeyleri; NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grupta (Grup 3) kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edilmiştir. NASH oluşumundan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verilen grupta (Grup 5) ise kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla anlamlı olarak ($p<0.01$) yüksek tespit edilmiştir. Steatohepatitli hastalarda çeşitli ajanlar hepatosit membranlarında lipit peroksidasyonunu indükleyebilen

oksijen radikallerinin üretimine yol açar. Serbest radikal bir gaz olan NO'nin de düzeyinde artış meydana gelir. NASH oluşumu sırasında kullandığımız bitkinin oksijen radikallerinin üretimini engelleyerek hastalığın ilerlemesinde koruyucu etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Lipid peroksidasyon damar sertliğine karşı koruyucu yağ asitlerinin oksidatif yıkımı gerçekleştirir ve yapısal bütünlüğün ve membran fonksiyonunun bozulmasına yol açar. Var olan çalışmalarda hiperoksalüri sırasında lipid peroksidasyonun önemli oranda arttığı gösterilmiştir. *Tribulus terrestris* lipid peroksidasyondan sorumlu serbest radikallerin düzeyini azaltarak malondialdehit seviyesini düşürmüştür. Meydana gelen bu azalma da *Tribulus terrestris*'in serbest radikalleri temizleme ve serbest radikal hasarını azaltma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde yer alan bu verilerden kaynağını alarak yapılan çalışmada *Tribulus terrestris* tedavisinde yükselmiş antioksidan enzimlerin aktivitesini ve gen ekspresyonunu dengelemek ile bu bitki özünün serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu doğrulanmıştır. Sonuç olarak da *Tribulus terrestris* oksidatif stresi azaltmış uygun böbrek işleyişini sağlamış ve böbrek hasarını azaltmıştır (179).

Diyabetik hastalarda hiperglisemi neticesinde sorbitol yolu aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Buna karşın NO sentezi içinde NADPH gereklidir. Bu nedenle aktive olmuş sorbitol yolu sorbitol azalmasına ve diyabetin vasküler komplikasyonlarının oluşmasına yol açar (Altan vd. 2006). Sağlıklı bireylerin koroner arterlerinde insülin endotel bağımlı

vazodilatasyona yol açar. Plazma glukoz konsantrasyonunun artması ise endotelden NO salgılanmasının azalmasına neden olur (Creager vd.2003).

NO'in üretiminde yer alan NOS'u inhibe eden ADMA'dır. ADMA proteinlerin posttranslasyonel metilasyonu yolu ile oluşur. ADMA'nın renal yolla atılmasının yanı sıra en temel metabolik yolu DDAH enzimiyle sitrulin ve dimetilamine yıkılımıdır. NOS aktivitesinde ADMA'nın önemli bir role sahip olduğunu son zamanlarda yapılan çalışmalar desteklemektedir. NOS aktivitesinin ADMA ile inhibisyonu sonucu NO sentezi olmadığından dolayı bu durum çeşitli klinik durumların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Yapılan birçok sayıdaki çalışma sonucunda ADMA düzeylerinde hafif artışların bile kardiyovasküler olayların oranında artışa sebep olduğu ortaya konulmuştur (180).

ADMA'nın inhibisyonu ile farelerde iskemik ve inflamatuvar uyaranlara karşı anjiyoadaptasyonun artış gösterdiğini, anjiyogenez ve arteriyogenezin iyileştiğini Jacobi ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonucunda ortaya koymuşlardır (181). Jang ve arkadaşları ise apolipoprotein eksikliği olan hiperkolestrolemik farelerde ADMA plazma düzeyinin yüksek olduğunu ve yükselmiş ADMA seviyesinin sadece bazal değil bFGF ile uyarılan anjiyogenezi de engellediğini bildirmişlerdir (182).

Yapmış olduğumuz çalışmada da ADMA düzeyleri NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* bitki eksraktı verdiğimiz grupta (Grup3) kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edilmiştir. NASH oluşumundan sonra *Tribulus terrestris* eksraktı verilen grupta (Grup 5) ise kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla anlamlı olarak ($p<0.01$) yüksek tespit edilmiştir. Ortaya çıkan sonuç bize kullandığımız bitkinin NASH oluşumu sırasında

koruyucu etki yaptığını ama NASH oluştuktan sonra tedavi üzerine yüksek oranda etki etmediğini göstermektedir.

Bendeck ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada rat karotid arterlerinde balon kateter ile endotel hasarı sonrasında doksisiklin kullanarak intimal kalınlaşmanın azaldığını ortaya koymuşlardır. Doksisiklinin MMP aktivitesinde azalmaya neden olur. Bu azalma sonucunda vasküler düz kas hücrelerinin medial alandan intimal alana migrasyonunun azaldığını ve intimal vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini beyan etmişlerdir. Fakat medial alandaki vasküler düz kas hücrelerini proliferasyonunu inhibe etmediğini gözlemlemişlerdir (183).

Islam ve arkadaşları çalışmalarında rat karotid arterlerinde balon kateter ile endotel hasarı sonrasında antibiyotik özelliğe sahip olmayan ve kimyasal olarak modifiye edilmiş olan tetrasiklin kullanarak intimal kalınlaşmanın azaldığını ortaya koymuşlardır. Tetrasiklinin MMP aktivasyonunu, vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu, medial ve intimal vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engelleyerek intimal kalınlaşmayı azalttığını göstermişlerdir. Tetrasiklinin medial vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engellemesinden dolayı doksisiklinden daha potent bir ilaç olduğunu belirtmişlerdir (184).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucunda koroner arter hastalarında plazma MMP-9 ve LDL kolesterol seviyelerinin kayde değer bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir (185). Koroner arter hastalıklarında artan MMP-9 düzeylerinin gelecekteki kardiyovasküler ölüm risklerinde artış meydana getireceği düşünülmektedir (186). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada serum

MMP-9 seviyelerinde meydana gelen artış okside LDL kolesterol seviyesini azaltarak aterosklerotik plak oluşumunu inhibe etmiştir (187).

Doku inhibitörü olan TIMP ve MMP gen ifadesini inceleyen Japon bilim adamları alkolden kaynaklanmayan yağlı karaciğer hastalığı olan hastada hiyaluronik asit düzeylerinin karaciğer fibrozu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Karaciğer dokusunda ileri fibrozis hastalarında ve serum seviyelerinde MMP düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (188). Yapmış olduğumuz çalışmamızda da NASH oluşturulan gruplarda MMP-2 düzeylerinde artış gözlenmiştir. NASH oluşumu sırasında *Tribulus terrestris* ekstratı verdiğimiz grupta (Grup3) diğer gruplara göre anlamlı olarak ($p<0.01$) yüksek tespit edilmiştir. NASH oluşumundan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verilen grupta (Grup5) ise kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edilmiştir. Bu da bize NASH oluşumu sırasında kullanılan bitki ekstratının koruyucu etki yapmayıp NASH oluştuktan sonra bu ekstratı verdiğimizde koruyucu etki yaptığını. NASH oluştuktan sonra tedavi aşamasında önemli yer tuttuğunu göstermektedir. MMP-9'un yüksek bulunması hem inflamatuvar olayların hem de lipid yüklü makrofajların tetiklediği ateroskleroz patogeneğinde kavşak bir enzim olduğunu göstermektedir.

“Hücre Adezyon Molekülleri (Cell Adesion Molecules; CAM)” biyolojik yapılarda hücre birlikteliğini sağlayan moleküler yapıştırıcılar olarak isimlendirilir. Adezyon molekülleri; hücre yüzeyinde yapısal olarak yer alan bazı uyarılarla hücre yüzeyinde belirgin hale gelen. hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşmesinde aktif rol oynayan membran bağımlı proteinlerdir. Hücre adezyon moleküllerinin en önemli fonksiyonları arasında hücre-hücre bağlantısı hücre

hareketi ve hücreler arası iletişim yer almaktadır. Hücre adezyon molekülleri bu fonksiyonlarının yanı sıra; doku ve karaciğer hastalıkları alerjik inflamasyon tromboz, anjiyogenez ve diabetes mellitus gibi birçok olayda da etkin bir role sahiptirler (189).

Turhan ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları bir çalışmada ICAM-1, VCAM-1 ve E-Selektin gibi adezyon moleküllerinin yavaş koroner akım tanısı konulmuş hastalarda endotelial aktivasyon ve inflamasyonun olası belirteçleri olup olmadıkları araştırılmıştır. Yavaş koroner akım tanısı konmuş hastaların plazma ICAM-1, VCAM-1 ve E-Selektin seviyelerini normal koroner akım olan kontrol grubu bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Elde edilen bu bulgulardan yola çıkarak, yavaş koroner akım olan hastalarda plazma ICAM-1, VCAM-1 ve E-Selektin düzeylerindeki artışın yavaş koroner akım patogenezinin sorumlu tutulan mikrovasküler düzeydeki endotelial aktivasyon ve inflamasyona yol açabileceği ve bu adezyon moleküllerinin endotelial aktivasyon ve inflamasyonun belirtecinde kilit bir role sahip olabileceğini öne sürülmüştür (189).

T. Chaiworapongsa ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma sonucunda VCAM-1 konsantrasyonlarında normal gruba oranla artış ICAM-1 konsantrasyonunda ise değişme olmadığını saptamamışlardır. Bu çalışmanın preeklampsi patofizyolojisinde endotel aktivasyonunun önemini vurgulamak için yapıldığını dile getirmişlerdir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular ışığında normal grupta lökosit ve platelet aktivasyonunun olduğunu fakat endotel hücre aktivasyonunun olmadığı bildirmişlerdir. Endotel hücre aktivasyonunun belirteci olan VCAM-1 konsantrasyon düzeylerindeki artışı preeklampsi patofizyolojisinde

endotel hücre aktivasyonunun önemini vurgulamaktadır. Yaptıkları bu çalışma ile preeklampsi patofizyolojisinde lökosit, trombosit ve endotel hücre aktivasyonunun önemini bir kez daha vurgulamışlardır (190).

Bizim de çalışmamızda ICAM-1 düzeyleri; NASH oluşumundan sonra *Tribulus terrestris* ekstratı verilen grupta (Grup5) kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç bize kullandığımız bitkinin NASH oluştuktan sonra koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. VCAM-1 düzeyleri ise bütün gruplarda birbirine yakın değerler sergilemiş olduğundan dolayı gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır.

Sonuç olarak; fruktoz verilerek NASH oluşturduğumuz ratlarda *Tribulus terrestris* ekstratı uygulanması ile; karaciğer fonksiyon testlerinde, karaciğer histopatolojisinde, lipid profilinde ve serum düzeylerinde göze çarpan bir düzelme gözledik. *Tribulus terrestris* ekstraktının kullanımı; NASH ve benzeri hastalıkların gelişimini önlemede ve tedavisinde önemli ve umut verici bir seçenek gibi görünmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Gastroenterolojide Klinik Yaklaşım. Yurdakul İ, Sentürk H, Tuncer MM, Göksoy E (editörler). 1.baskı. İstanbul Deomed Medikal Yayıncılık; 2004: 171-80.
2. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc 1980; 55(7): 434-8.
3. 10.Sonsuz A: Karaciğer yağlanması. Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A Cerrahpaşa İç Hastalıkları. İstanbul Medikal yayıncılık. 2005: 920-927.
4. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. CMAJ 2005; 172(7): 899-905.
5. Angulo P, Non alcoholic fatty liver disease. New England Journal of Medicine. 2002; 346(16): 1221-31.
6. MacLaren D, Bitar J, Nassar V. Protein-calorie malnutrition and the liver. Prog Liver Dis 1972; 4: 527-36.
7. Jesus M, Luis IF, Luisa GB, Ricardo MO. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. Diabetes Care 2004; 27: 2057-2065.
8. Anne B, Michael RL. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. American Journal of Transplantation 2004; 4: 686-693.
9. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes Semin Liver Dis 2001; 21(1): 17-26
10. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM, Nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2002; 122: 1649-57.
11. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, et al. Liver fibrosis in overweight patients. Gastroenterology 2000; 118: 1117-23.
12. Cortez-Pinto H, Camilo ME. Non-alcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): diagnosis and clinical course. Best Practice Clinical Gastroenterology 2004; 18: 1089-104.
13. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. Digestive Diseases And Sciences 2000; 45: 1929-1934.
14. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease. American Journal Of Gastroenterology 2003; 98: 2042-47.
15. Neuschwander Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. Hepatology 2003; 37(5): 1202-19.

16. Çelebi S, Atasever H, Mengüçük D, Açık Y, Bahçecioğlu H, Elazığ kent toplumunda nonalkolik yağlı karaciğerin epidemiyolojik özellikleri. *Akademi Gastroenteroloji Dergisi* 2006; 5(1): 41-6.
17. Daniel S, Ben-Menachem T, Vasudevan G, Ma CK, Blumenkehl M. Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3010-14.
18. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 1007: 1103-09.
19. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-62.
20. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-10.
21. Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1349-55.
22. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-5.
23. Day C: Pathogenesis of steatohepatitis. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2002; 16(5): 663-678.
24. Sheth SG, Bass NM, Raghupathy E, Rhoads DE, Manning JA, Ockner RK. Partial purification of molecular weight 12000 fatty acid binding proteins from rat brain and their effect on synaptosomal Na⁺ dependent amino acid uptake. *Biochemistry* 1984; 23: 6539-44.
25. Nguyen N, Glanz D, Glaesser D. Fatty acid cytotoxicity to bovine lens epithelial cells: investigations on cell viability. ecto-ATPase. Na⁺/K⁺- ATPase and intracellular sodium concentrations. *Exp Eye Res* 2000; 71: 405-413.
26. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR, CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical investigation* 2000; 105: 1067-75.
27. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2001; 21: 57-69.
28. Baldrige AD, Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al. Tissuespecific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7522-27.
29. Brunt EM, Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004; 30: 121-138.
30. Pessayre D, Fromenty B, NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005; 42: 928-940.

31. 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.
32. Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 1999; 19: 221-229.
33. Diehl AM, Poordad F. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. *Gastrointestinal and Liver Disease*. 7th ed. Volume 2. Philadelphia: Saunders. 2002: 1393-1401.
34. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S, Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137.
35. Agarwal N, Sharma BC. Insulin resistance and clinical aspects of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Research* 2005; 33: 92-6.
36. Zafrani ES, Non-alcoholic fatty liver diseases: An emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004; 444: 3-12.
37. Takahashi T, Kamaimura T, Ichida H, Ultrastructural findings on polymorphonuclear leucocyte infiltration and acute hepatocellular damage in alcoholic hepatitis. *Liver* 1987; 7: 347-358.
38. Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE, Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *Journal of pediatrics* 1995; 127: 700-704.
39. Brunt EM, Tiniakos DG, Pathology of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 691-707.
40. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-55.
41. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA, Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-09.
42. Garcia-Monzon C, Martin-Perez E, Iacono OL, et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000; 33: 716-724.
43. Angulo P, Keach JC, Independent predictors of liver fibrosis in patients with. *Hepatology* 1999; 30: 1356-62.
44. Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, de Moura MC. Non alcoholic steatohepatitis: clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dic Dis Sci* 1996; 41: 172-179.
45. Cotler SJ, Kanji K, Keshavarzian A, et al. Prevalence and significance of autoantibodies in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin Gastroenterol* 2004; 38: 801-4.
46. Sorrentino P, Tarantino G, Conca P, et al. Silent non-alcoholic fatty liver disease a clinical histological study. *J. Hepatol* 2004; 41: 751-7.

47. Grove J, Daly AK, Burt AD, et al. Heterozygotes for HFE mutation have no increased risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut* 1998; 43: 262-6.
48. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver diseases. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-25.
49. Arthur J, McCullough. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34(3): 255-62.
50. Harrison SA, Bisceglie AMD. Advances in the understanding and treatment of 70.77.78]. Nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* 2003; 63(22): 2379-94.
51. Angulo P, Linkor KD, Treatment of Nonalcoholic fatty liver. Present and emerging therapies. *Semin Liver Dis.* 2001; 21(1): 81-88.
52. Marchesini G, et al. Metformin in nonalcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001; 358: 893-94.
53. Yeşil T. *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) türü üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 116s, 2010.
54. Mutlu M. *Tribulus terrestris* (Zygophyllaceae) bitkisinden elde edilen ekstraktların kimyasal içeriklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 57s, 2002.
55. Adimoelja A, Ganesan A. P. Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L. Improves male sexual functions possibly via DHEA. *International Journal of Impotence Research.* 1997; 9(1): 64.
56. Özen N. Hayvan besleme fizyolojisi ve metabolizması. Antalya: Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü (Genişletilmiş 2. Baskı), 343s, 1995.
57. Tan R. S., Culbertson J. W. An integrative review on current evidence of testosterone replacement therapy for the andropause. *Maturitas*, 2003; 45: 15-27.
58. Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N. Study of antihypertensive mechanism of *Tribulus Terrestris* in 2K1C hypertensive rats: role of tissue ACE activity. *Life Sci* 2003; 73: 2963-71 ve Philips OA, Mathew KT, Oriowo MA. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 104: 351-5.
59. Tuncer MA, Yaymaci B, Sati L, Cayli S, Acar G, Altuğ T, et al. Influence of *Tribulus terrestris* extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet. *Acta Histochem* 2009; 111: 488-500.
60. Wang B, Ma L, Liu T, 406 cases of angina pectoris in coronary heart disease treated with saponin of *Tribulus terrestris*. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1990; 10: 85-7.
61. Li M, Qu W, Chu S, Wang H, Tian C, Tu M. Effect of the decoction of *tribulus terrestris* on mice gluconeogenesis. *Zhong Yao Cai.* 2001; 24(8): 586-8.

62. Arcasoy HB, Erenmemisoglu A, Tekol Y, Kurucu S, Kartal M. Effect of *Tribulus Terrestris* L. Saponin mixture on some smooth muscle preparations: a preliminary study. *Boll Chim Farm.* 1998; 137(11): 473-5.
63. Hong CH, Hur SK, Oh OJ, Kim SS, Nam KA, Lee SK. 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(12): 153-9.
64. Duru M. Yohimbe bark (*Pausinystalia yohimbe*) ve demir dikenini (*Tribulus terrestris*) ekstraktlarının etlik civcivlerde büyüme performansı ve vücut bileşimi üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hatay: Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 62s, 2005.
65. Oludotun A. Phillips, Koyipalli T. Mathew, Mabayoje A. Oriowo. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 104: 351-55.
66. Amin A, Lotfy M, Shafiullah M, Adeghate E. The protective effect of *Tribulus Terrestris* in diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1084: 391-401.
67. 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.
68. 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.
69. Şahin. Effects of dietary *Tribulus terrestris* L. Powder on growth performance, body components and digestive system of broiler chicks. *Journal of Applied Animal Research.* 2009; 35(2); 193-5.
70. Libby P, Lee RT, Matrix matters, *Circulation* 2000;102: 1874-6.
71. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 1999. p. 968-93.
72. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S, Matrix metalloproteinases: Structures. evolution. and diversification. *FASEB J* 1998; 12: 1075-95.
73. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 195-202.
74. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1119-27.
75. Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure. Function. and biochemistry. *Circ. Res.:* 2003; 92: 827-839.
76. Vu T.H and Werb Z.: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes And Development:* 2000; 14: 2123-33.

77. Trinkaus M, Vranič A, Dolenc VV, Lah TT: Cathepsin L in human meningiomas. *Radiol. Oncol.* 2003; 37(2): 89-99.
78. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
79. Birkedal-Hansen H, Moore W.G.I, Bodden M.K, Windsor L.J, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A and Engler J.A: Matrix Metalloproteinases: A Review: Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 1993; 4(2): 197-250.
80. Woessner J.F. Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5(8): 2145-54.
81. Johansson N, Ahonen M and Kähäri V.M: Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol. Life Sci.* 2000; 20;57(1): 5-15.
82. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution. structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267–83.
83. Kuzuya M, Iguchi A, Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 275-82.
84. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; 99: 157-66.
85. Lijnen H.R.: Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2002; 30(2): 163-7.
86. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 812-23.
87. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; 77: 863-8.
88. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60.
89. Dollery CM, Libby P, Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res.* 2006; 15;69(3): 625-35.
90. Creemers E.E, Cleutjens J.P, Smits J.F and Daemen M.J: Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ. Res.*; 2001; 3;89(3): 201-10.
91. Phatharajaree W, Phrommintikul A, Chattipakorn N. Matriksmetalloproteinases and myocardial infarction. *Can J Cardiol* 2007; 23(9): 727-33.
92. Nagase H, Visse R, Murphy G, Structure and function of matriksmetalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006; 15;69(3): 562.
93. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 49(3): 187-98.
94. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matriksmetalloproteases and their inhibitors in tumour invasion. metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J.* 1994; 7(11): 2062-72.

95. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 121-31.
96. Loftus IM, Thompson MM. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med* 2002 ;7: 117-33.
97. Cho A, Graves J, Reidy MA. Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2527-32.
98. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 11924-9.
99. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-62.
100. Zaltsman AB, Newby AC. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: Relationship to lesion severity. *Atherosclerosis* 1997; 130: 61-70.
101. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW, Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 28-33.
102. Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS, Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 2000; 102: 2861-6.
103. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997; 17: 439-44.
104. Carrell TW, Burnand KG, Wells GM, Clements JM, Smith A, Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2002 ;105: 477-82.
105. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *Palme yayıncılık* 2003.
106. Lüscher TF, Barton M 1997 Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*:20 (suppl II): II-3- II-10.
107. Lancaster JR. JR in Nitric Oxide: Biology and Pathobiology Ignarro. LJ. ed. Academic Press. San Diego. CA 2000: p. 209-224.
108. Behrendt D, Ganz P 2002 Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 90(suppl):40-48.
109. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 2001; 64: 365–91.

110. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina* 2003; 39(4): 333-41.
111. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 521-534.
112. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1023-30.
113. Hu T, Chouinard M, Cox Amy L, Sipes P, FXR Agonist reduces serum ADMA levels through hepatic DDAH-1 gene regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 2006.
114. Mittermayer F, Pleiner J, Krzyzanowska K, Wiesinger F, Francesconi M, Wolzt M, Regular physical exercise normalizes elevated ADMA concentrations in patients with Type 1 Diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 117/23-24: 816-820.
115. Beltowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacological Reports* 2006; 58: 159-178.
116. Valkonen V-P, Laaksonen R, Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clin Chim Acta* 2004; 348: 9-17.
117. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CDA, Parving. H-H: Elevated Plasma ADMA as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 765-769.
118. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13527-32.
119. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: preeclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005; 1: 98-114.
120. Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003 ;4: 41-51.
121. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005; 10: 11-7.
122. Won Bae S, Stühlinger MC, Yoo HS, Hyun KY, Park HK, et al. Plasma ADMA Concentrations in Newly Diagnosed Patients With Acute Myocardial Infarction or Unstable Angina Pectoris During Two Weeks of Medical Treatment *Am J Cardiol* 2005; 95: 729–733.
123. Hori T, Matsubara T, Ishibari T, Ozaki K, Tsuchida K, Mezaki T, et al. Significance of ADMA concentrations during coronary circulation in patients with vasospastic angina. *Circ J* 2003; 67: 305-11.
124. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. ADMA: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-7.

125. Siroen MP, Van der Sijp JR, Teerlink T, Van Schaik C, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethyl arginine. *Hepatology* 2005; 41: 559-65.
126. Siroen MP, Warle MC, Teerlink T, Nijveldt RJ, Kuipers EJ, Metselaar HJ, et al. The transplanted liver graft is capable of clearing asymmetric dimethylarginine. *Liver Transpl* 2004; 10: 1524-30.
127. Lluch P, Torondel B, Medina P, Segarra G, Del Olmo JA, Serra MA, et al. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 41: 55-9.
128. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K, Purification and properties of a new enzyme. NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. *J Biol Chem.* 1989; 264: 10205-209.
129. Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T, Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem.* 1995; 117: 237-238.
130. Cooke JP, Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2032-37.
131. Tran Cam TL, Fox MF, Vallance P, Leiper J, Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000; 68: 101-5.
132. Leiper J, MacAllister R, Whitley G, Santa Maria J, Chubb A, Charles I, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases. *Biochem J.* 1999; 343: 209-214.
133. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1533-40.
134. Nijveldt R.J, .Siroen M.PC, Teerlink T and Leeuwen M.V. Elimination of ADMA by the Kidney and the Liver: A Link to the Development of Multiple Organ Failure. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 2004; 134: 2848-2852.
135. Nijveldt J, Robert, Leeuwen van paul A, Guldener van Coen, Stehouwer D.A.Coen, Rauwerda A, Jan and Teerlink Tom. Net renal extraction of ADMA and SDMA in fasting humans. *Nephrol Dial transplant* 2002; 17: 1999-2002.
136. Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Relations between plasma ADMA and risk factors for coronary disease. *Atherosclerosis* 2006; 184: 383-388
137. Feldman M. Intercellular adhesion molecules. In: Roitt I, Brastaff J, Male D. eds. *Immunology.* Barselona: Mosby. 1996; 143-5.

138. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part I. *N Engl J Med* 1996; 334: 1527-9.
139. Lynos AJ, Jones J. Cell adhesion molecules. the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg* 2007; 36: 671-679.
140. Holtfreter J. Significance of the cell membrane in embrionic processes. *Ann NY Acad Sci* 1948; 49: 709-760.
141. G.Dicle. Adezyon Molekülleri. *Astım Allerji İmmünoloji* 2004; 2: 95-102.
142. Hynes RO. Integrins: versatility. modulation. and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
143. Etzioni A. Adhesion molecules their role in health and disease. *Ped Res* 1996; 39: 191-8.
144. Szekanecz Z, Haines GK, Harlow LA, Shah MR, Fong TW, Fu R, Lin SJ, Koch AE. Increased synovial expression of the adhesion molecules CD66a. CD66b. and CD31 in rheumatoid and osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76: 180-6.
145. Springer TA. Adhesion receptors of immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34.
146. Lasky LA. The homing receptor (LECAM-1/L-selection). In: Harlan Jm. Liu DY. eds. *Adhesion: Its role in inflammatory disease*. New York: WH Freeman. 1992; 5-88.
147. Behrens J. Cadherins as determinants of tissue morphology and supressors of invasion. *Acta Anat (Basel)* 1994; 149: 165-9.
148. Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K ve ark. Transformation of cell adhesion properties by exogeneously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 1987; 329: 341-3.
149. Libby P, Li H. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest* 1993; 92: 538-9.
150. Schmid-Schonbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8: 93-131.
151. Crockard AD, Boylan MT. Corticosteroids Effects on Neutrophil Adhesion Molecules. *Int J Clin Laboratuvar Res* 1998; 28: 110-5.
152. Tanaka S, Sakata Y, Morimoto K, Tambe Y, Watanabe Y, Honda G, Tabata M, Oshima T, masuda T, Umezawa T, Shimada M, Nagakura N, Kamisako W, Kashiwadw Y, Ikeshiro Y. Influence of naturel and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules. ICAM-1 and VCAM-: *Planta Med* 2001; 67(2); 108-13.
153. Wilson GA. *Cell Adhesion Molecules Fundamental Facts*. R&D Systems. 1996.
154. Greer IA, Dawes J, Johnstone FD, Calder AA. Neutrofil activation in pregnancy induced hypertension. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96(8); 978-82.
155. Foster CA. VCAM-1/Alfa 4 integrin adhesion pathway; therapeutic target for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 270-7.

156. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 18;104(12): 1336-42.
157. Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Cellular adhesion molecules and peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2006; 11: 39-47.
158. Seiffge D. Protective effects of monoclonal antibody to VLA-4 on leukocyte adhesion and course of disease in adjuvant arthritis in rats. *J Rheumatol* 1996; 23: 2086-91.
159. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T, Yamanouchi T. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J. Nutr* 2009; 39: 2067-71.
160. Nanji AA, Yang EK, Fogt F, Sadrzadeh SMH, Dannenberg AJ. Medium chain triglycerides and vitamin E reduce the severity of established 86 experimental alcoholic liver disease. *J Pharma Exper Ther* 1996; 277: 1694-99.
161. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Bopari N, Liu Y, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 107: 1103-9.
162. Teri MR, James OFW, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of non-Alcoholic steatohepatitis: a follow up study. *Hepatology* 1995; 22: 1714-19.
163. Farrel GC. "Non-alcoholic Steatohepatitis: What is it. and Why is it Important in the Asia-Pacific Region?". *J.Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 18: 124-138.
164. Al-Ghaithi F, El-ridi MR, Adeghate E, Amiri MH. Biochemical effects of citrullus colocynthis in normal and diabetic rats. *Mol Cel Biochem.* 2004; 261(1-2): 143-9.
165. Kusunkoi M, Tsutsumi, Inove Y, Hara T, Miyata T, Ogawa H, Sakakibara F, Fukuzawa Y, Okabayashi N, Kato K, Ikeda H, Kurokawa T, Ishikawa T, Otake K, Nakaya Y. Lipoprotein lipase activator-1886 improves fatty liver caused by high-fat feeding in streptozotocin induced diabetic rats. *Metabolism.* 2004; 53(2): 260-63.
166. Miriam B, Vos Ryan Colvin, Patricia Belt, Jean P, Molleston, Karen F, Murray, Philip Rosenthal, Jeffrey B, Schwimmer, James Tonascia, Aynur Unalp, Joel E, Lavine, Correlation of Vitamin E. Uric Acid and Diet composition with histologic features of pediatric NAFLD. *JPGN* 2012; 54: 90-96.
167. Lavine JE. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatr* 2000; 136: 734-8.
168. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, et al. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003; 38: 413-9.
169. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for NASH. *N Engl J Med* 2010; 362: 1675-85.
170. Pietu F, Guillaud O, Walter T, Vallin M, Hervieu V, Scoazec JV, et al. Ursodeoxycholic and with vitamin E in patients with nonalcoholic steatohepatitis: long-term results. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36: 146-55.

171. Dufour JF, Oneta CM, Gonvers JJ, Bilhl F, Cerny A, Cereda JM, et al. Swiss Association for the Study of the liver. Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin E in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1537-43.
172. Balmer ML, Siegrist K, Zimmermann A, Dufour JF, Effects of ursodeoxycholic acid in combination with vitamin E on adipokines and apoptosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2009; 29: 1184-8.
173. Ravichandran Ranjithkumar, S. Prathab Balaji, Bhaskar Balaji, R.V. Ramesh, Muthiah Ramanathan. Standardized Aqueous Tribulus Terrestris (Nerunjil) extract attenuates hyperalgesia in experimentally induced diabetic neuropathic pain model: role of oxidative stress and inflammatory mediators. *Phytother. Res.* 2013; 27: 1646-57.
174. Fenster BE, Tsao PS, Rockson SG, Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. *Am Heart J* 2003; 146: 218-26.
175. Wever M, Luscher TF, Cosentino F, et al. Atherosclerosis and two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998; 97: 108-12.
176. Reid, AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001; 121: 710-23.
177. Koji Fujita, Yuichi Nozaki, Masato Yoneda, Koichiro Wada, Hirokazu Takahashi, Hiroyuki Kirikoshi, Masahiko Inamori, Satoru Saito, Tomoyuki Iwasaki, Yasuo Terauchi, Shiro Maeyama, and Atsushi Nakajima, Nitric Oxide plays a crucial role in the Development/ Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis in the choline-deficient, L-Amino acid-defined diet-fed rat model. *Alcohol Clin Exp Res.* Vol. 34. No 5. 2010: pp 18-24.
178. Takamatsu Y, Shimada K, Yamaguchi K, Kuroki S et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents hepatic, but not pulmonary, injury following ischemia-reperfusion of rat liver. *Dig Dis sci* 2006; Mar 51(3), 571-9.
179. Kamboj P, Aggarwal M, Puri S, Singla SK. Effect of aqueous extract of Tribulus Terrestris on oxalate-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Nephrology* 2011; 21: 154-59.
180. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1023-30.
181. Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, Wang B, et al. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* 2005; 111: 1431-8.
182. Jang JJ, Ho HK, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP, Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of ADMA. *Circulation* 2000; 102: 1414-9.

183. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol* 2002; 160(3): 1089-95.
184. Islam MM, Franco CD, Courtman DW, Bendeck MP. A nonantibiotic chemically modified tetracycline inhibits intimal thickening. *Am J Pathol* 2003; 163: 1557-66.
185. Wang KF, Huang PH, Chiang CH, Hsu CY, Leu HB, Chen JW, Lin SJ. Usefulness of plasma matrix MMP-9 level in predicting future coronary revascularization in patients after acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2013 ;24: 23-28.
186. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of MMP-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-85.
187. You Y, Duan Y, Zhang XL, Kang J, Yan CH, Zhang XL, et al. Effects of astragalus radix extract on MMP-9 expression and atherosclerotic plaque formation in aorta of apolipoprotein E deficient mice fed with high fat diet. 2012; 40: 522-26.
188. Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Murakami Y. Higher hepatic gene expression and serum levels of MMP-2 are associated with steatohepatitis in non-alcoholic fatty liver diseases. *Department of Gastroenterology* 2013; 18(1): 82-7.
189. Turhan H, Saydam GS, Erbay AR, et al. Increased plasma soluble adhesion molecules: ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin levels in patients with slow coronary flow. *Int J Cardiol* 2006; 108: 224-30.
190. Chaiworpong T, Romero R, Yoshimatsu J, Espinosa J, Kim YM, Park K, Kalache K, Edwin S, Bujold E, Gomez R. Soluble adhesion molecule profile in normal pregnancy and preeclampsia. *The Journal of maternal-fetal and Neonatal medicine* 2002; 12(1): 19-27.

8.ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Malatya’da doğdum. 2007 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2011 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açtığı sınavı kazanarak Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım.