

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

**EGZERSİZLE İNDÜKLENEN HSP72'NİN GLUKOKORTİKOİD KAYNAKLI  
İSKELET KASI ATROFİSİNİ ÖNLEMESİNDEKİ ROLÜ**

**Berkay ÖZERKLİĞ**

**Spor Bilimleri ve Teknolojisi  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2020**

## TEŞEKKÜR

Farklı bir lisans eğitiminden gelmeme rağmen, spor ve egzersize olan ilgimi laboratuvarına beni kabul ederek gösterebilme olanağı veren, okumayı, araştırmayı ve bu birikimi nasıl tartışacağımı öğreten ve sevdiren, bu tez çalışması da dahil olmak üzere bütün çalışmalarımızın ortaya çıkarılmasını, desteklenmesini ve hayata geçirilmesini sağlayan ve her konuda yanımda olan hocam Sayın Prof. Dr. A. Haydar DEMİREL'e,

Laboratuvara girdiğim ilk günden itibaren bana bildiğim her şeyi öğreten, tüm bilgi birikimini paylaşan, beni bu tez çalışmasını yapabilecek düzeye getiren ve tezimin bütün aşamalarında bana yol gösteren danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şenay AKIN'a,

İlk günden bu yana her konuda bana destek olan, tecrübelerini paylaşan, hiçbir yardımını esirgemeyen, özellikle de tez çalışmamda bütün deneylerimin başından sonuna kadar kendi çalışması gibi titiz bir şekilde takip eden, beraber çalıştığım arkadaşım Öğr. Gör. İbrahim TÜRKEK'e,

Bütün çalışmalarda karşılık beklemeden özveriyle çalışan, her zaman yardım için hazır bekleyen arkadaşlarım Ümit HAYTA ve Gökhan Burçin KUBAT'a,

Belki de bir çok insanın anlamakta zorlandığı avukatlık kariyerimden vazgeçip Spor Bilimleri alanında ilerleyerek Yüksek Lisans yapmam da dahil, beni her zaman anlamaya çalışan ve her türlü kararımın arkasında olan aileme teşekkür etmek isterim.

## ÖZET

**Özerkliğ B, Egzersizle İndüklenen Hsp72'nin Glukokortikoid Kaynaklı İskelet Kası Atrofisini Önlenmesindeki Rolü Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.** Fizyolojik ve patolojik bir çok koşul ya da hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçlar iskelet kası atrofisine neden olur. Glukokortikoidler immünosupresif ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle çok sayıda hastalığın tedavisinde eksojen olarak yaygın bir biçimde kullanılmakta olup, ilaç kaynaklı kas atrofisinin birincil nedenidir. Kas protein sentezinin azalması ve protein yıkımının artması iskelet kası atrofisi ile sonuçlanırken, glukokortikoid kaynaklı atrofide temel mekanizmanın protein yıkımındaki artış olduğu bildirilmiştir. Egzersizin iskelet kası atrofisinin önlenmesinde bilinen en etkili yöntem olduğu ve glukokortikoid kaynaklı kas atrofisini engellediği veya azalttığı bilinmektedir. Aerobik egzersizlere bağlı olarak hücrede ortaya çıkan değişikliklerden biri sıcaklık artışıdır. Vücut sıcaklığını bir kaç derece artıran bir sıcak stresi, hücrede sıcak şoku proteinleri adı verilen bir grup proteini hızla indükler ve özellikle artan Hsp72 hücresel homeostazın korunmasında kritik rol oynar. Egzersizin artan kontraktilete ve metabolik aktiviteye bağlı olarak çok farklı hücre içi sinyal yolağını uyardığı bilinmesine karşın, glukokortikoid kaynaklı kas atrofisini hangi hücre ve moleküler mekanizmalarla önlediği aydınlatılabilmemiş değildir. Bu çalışma egzersizin glukokortikoid kaynaklı kas atrofisini önlenmesine ilişkin etkisini Hsp72 üzerinden gerçekleştirdiği hipotezini test etmek amacı ile planlanmıştır. Çalışmada 3-4 aylık dişi Sprague Dawley sıçan; kontrol (K), deksametazon (D), normal egzersiz (NE), normal egzersiz ve deksametazon (NED), soğuk egzersiz (SE) ve soğuk egzersiz ve deksametazon gruplarına (SED) (n=8/grup) ayrılmıştır. Egzersiz gruplarındaki sıçanlara 5. günden itibaren kademeli olarak 30m/dk hız ve 60 dk/gün süreye ulaşacak şekilde 10 günlük koşu egzersizi yaptırılmıştır. D, SED ve NED gruplarına 6-10. günlerde 1mg/kg/gün dozda 5 gün süreyle subkutan deksametazon enjeksiyonu yapılmıştır. Plantaris kasında atrofi kas ağırlığının başlangıç vücut ağırlığına bölünmesi ile belirlenmiş ve Hsp72, p-Akt, Akt ve p-FoxO3 düzeyleri Western Blot yöntemi ile belirlenmiştir. Grupların plantaris kas ağırlıkları karşılaştırıldığında D grubu K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ( $p<0,05$ ), diğer taraftan SED ve NED gruplarının kas ağırlıkları D grubuna göre daha fazlayken ( $p<0,05$ ) yalnızca NED grubu K grubundan farklı değildir ( $p>0,05$ ). NE ve NED gruplarının Hsp72 düzeyleri K grubuna göre artmıştır ( $p<0,05$ ). K grubu ile karşılaştırıldığında D, SED ve NED gruplarının p-Akt düzeyleri azalırken ( $p<0,05$ ) NED grubu p-Akt düzeyleri hem D hemde SED grubundan yüksektir ( $p<0,05$ ). Ayrıca, grupların p-FoxO3 düzeyleri karşılaştırıldığında yalnızca NED grubunun D grubundan yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Sonuç olarak, deksametazon kaynaklı iskelet kası atrofisinden normal sıcaklıktaki ortamda egzersiz yaptırılan sıçanların plantaris kasları, soğuk ortamda egzersiz yapan sıçanlara göre K grubuna kıyasla daha fazla korunmuştur (SED-K;  $p<0,05$  ve NED-K;  $p>0,05$ ) ve bu bize egzersizin glukokortikoid atrofisinden korumasındaki rolünü kısmen de olsa Hsp72 üzerinden oynadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Egzersiz, iskelet kas atrofisi, sinyal iletimi, Hsp72, Akt

Bu tez çalışması 219S175 numaralı Türkiye Bilimsel Ve Teknolojik Araştırma Kurumu (Tübitak) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Özerkliğ B, The Role of Exercise Induced Hsp72 in Preventing Glucocorticoid Induced Skeletal Muscle Atrophy. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Sport Sciences and Technology Programme Master's Degree Thesis, Ankara, 2020.** Many physiological and pathological conditions or drugs used for the treatment of diseases cause skeletal muscle atrophy. Glucocorticoids are widely used exogenously in treating many diseases due to their immunosuppressive and anti-inflammatory properties and are the primary cause of drug-induced muscle atrophy. It is very well known that exercise prevents skeletal muscle atrophy, and glucocorticoid-induced muscle atrophy is not an exception. One of the changes that occur in the organism due to aerobic exercises is the elevation of body temperature. It has been known that the body temperature increases a few degrees rapidly as a consequence of heat stress and induces a group of proteins in the cell called heat shock proteins. Notably, the increase in Hsp72 plays a critical role in maintaining cellular homeostasis and preventing skeletal muscle atrophy. Therefore, exercise plays a crucial role in various intracellular signaling pathways due to increased contraction and metabolic activity. However, it is remarkably essential to investigate the mechanisms in muscle cells activated by exercise and protect skeletal muscle from glucocorticoid-induced muscle atrophy. This study was designed to elucidate whether exercise protects against glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy in an Hsp72 dependent manner. To this end, 3-4 month female Sprague Dawley rats were divided into following study groups: control (C), dexamethasone (D), warm exercise (WE), warm exercise and dexamethasone (WED), cold exercise (CE), and cold exercise and dexamethasone (CED) (n = 8). The rats in the exercise groups were given a 10-day running exercise gradually increasing the speed and duration of 30m/min 60min/day from the 5<sup>th</sup> day. Dexamethasone was injected subcutaneously at a dose of 1mg/kg/day for 5 days to D, CED, and NED groups. Skeletal muscle atrophy was determined by dividing plantaris weight by the initial body weight, and the levels of Hsp72, p-Akt, Akt, and p-FoxO3 were determined by Western Blot. D groups plantaris muscle weight decreased significantly compared to the C group (p < 0.05), while the muscle weights of the CED, and WED groups were higher than the D group (p < 0.05), while only the WED group was not different from the C group (p > 0.05). Hsp72 levels of the WE and WED groups were significantly increased compared to the C group (p < 0.05). Compared with the C group, the p-Akt levels of the D, CED and WED groups decreased significantly, while the p-Akt levels of the WED group were significantly higher than both the D and CED groups (p < 0.05). Finally, when the p-FoxO3 levels of the groups were compared, it was seen that only the WED group was significantly higher than the D group (p < 0.05). As a result, both exercising groups with dexamethasone injection (CED and WED) attenuated plantaris muscle atrophy (p < 0.05). On the other hand, while there was no significant difference between control and WED groups (p > 0.05), plantaris muscle weight of group CED was significantly lower than control (p < 0.05). These results indicate that elevated body temperature plays a role in preventing glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy through the expression of Hsp72 during exercise.

**Key Words:** Exercise, skeletal muscle atrophy, signal transduction, Hsp72, Akt

This thesis is funded by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (Tübitak), project no:219S175

## İÇİNDEKİLER

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
2.1. Protein Sentez Yolağı	7
2.2. Protein Degradasyon Yolağı Ubikütin Proteozom Sistem	8
2.3. Glukokortikoidler ve Fizyolojik Etkileri	10
2.3.1. Glukokortikoidler ve İskelet Kas Atrofisi	11
2.4. Sıcak Şoku Proteini (Hsp72) ve İskelet Kas Atrofisi	12
2.4.1. Glukokortikoid Kaynaklı Kas Atrofisi ve Hsp72	13
2.5. Egzersizin İskelet Kas Atrofisini Önlemedeki Rolü	15
2.5.1. Egzersiz ile İndüklenen Hsp72	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>19</b>
3.1. Araştırma Grubu	19
3.2. Deney Grupları	19
3.3. Egzersiz Protokolü	20
3.4. Deksametazon Enjeksiyonu	21
3.5. Vücut Sıcaklığının Ölçümü	22
3.6. Ötenazi Ve Doku İzolasyonu	22
3.7. Analiz Yöntemleri	22
3.7.1. Protein Analizi	22
3.7.2. Western Blot Analizi	23

3.7.3. Verilen Analizi	24
<b>4. BULGULAR</b>	25
4.1. Dekametazon ve Egzersizin Vücut ve Kas Ağırlığına Etkileri	25
4.2. Dekametazon ve Egzersizin Protein Düzeylerine Etkileri	29
<b>5.TARTIŞMA</b>	32
5.1. Plantaris Kas Ağırlığındaki Değişiklikler	33
5.2. Vücut Sıcaklığı ve Hsp72 Bulguları	36
5.3. Akt ve FoxO Bulguları	37
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	40
<b>7. KAYNAKLAR</b>	42
<b>8. EKLER</b>	
EK 1. Etik Kurul Onayı	
EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 3. Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>Akt</b>	Protein kinaz B
<b>BVA</b>	Başlangıç Vücut Ağırlığı
<b>FoxO1</b>	Forkhead box O1
<b>FoxO3a</b>	Forkhead box O3a
<b>GAPDH</b>	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
<b>HSP</b>	Sıcak şoku proteinleri
<b>IGF1</b>	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
<b>MAFbx</b>	Atrogin-1 (Muscle atrophy F-box)
<b>mTOR</b>	Memelilerde Rapamisinin Hedefi
<b>MuRF1</b>	Muscle RING-finger protein-1
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 kinaz
<b>TGFβ</b>	Dönüştürücü büyüme faktörü β
<b>UPS</b>	Ubikülin Proteazom Sistemi
<b>VA</b>	Vücut Ağırlığı

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İskelet kası protein sentez ve degradasyon yolları .	7
2.2. Akt'nin FoxO transkripsiyon faktörlerini düzenlemesi.	10
2.3. Glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisinin moleküler mekanizması.	14
2.4. Vücut sıcaklığının arttığı ve artmadığı egzersiz koşullarında, glukokortikoid kaynaklı kas atrofisi moleküler mekanizması.	18
3.1. Sıçanlar için üretilmiş motorize koşu bandı.	21
4.1. Grupların 0.gün ağırlıklarına göre % vücut ağırlığı değişimleri.	26
4.2. Farklı ortam sıcaklıklarında egzersiz yapan SE ve NE gruplarının egzersiz öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları .	28
4.3. Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam sıcaklıklarında egzersizin iskelet kası Hsp72 protein düzeylerine etkisi (Western Blot).	29
4.4. Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam sıcaklıklarında egzersizin Hsp72 protein düzeyleri üzerine etkisi (Western Blot bantlarının yarı nicel analizi).	29
4.5. Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin iskelet kası p-Akt ve Akt1 protein düzeylerine etkileri (Western Blot görüntüleri)	30
4.6. Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin p-Akt/Akt1 düzeyleri üzerine etkisi (Western Blot bantlarının yarı nicel analizi).	30
4.7. Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin iskelet kası p-FoxO3a/GAPDH protein düzeylerine etkisi (Western Blot).	31
4.8. p-FoxO3a ve GAPDH Western Blot görüntüleri. Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin p-FoxO3a/GAPDH düzeyleri üzerine etkisi (Western Blot bantlarının yarı nicel analizi).	31



**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	Deney dizaynı	21
<b>3.2.</b>	Western Blot için Birincil Antikorlar	23
<b>4.1.</b>	Deney Hayvanları Vücut Ağırlıkları (VA).	25
<b>4.2.</b>	Plantaris kas ağırlıklarının başlangıç vücut ağırlıklarına oranları (BVA).	26
<b>4.3.</b>	Plantaris kas ağırlıklarının başlangıç vücut ağırlıklarına (BVA) oranlarının p değeri tablosu.	27
<b>4.4.</b>	Deney hayvanlarının egzersiz öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları (°C).	28

## 1. GİRİŞ

Vücut ağırlığının yaklaşık %40-50'sini oluşturan iskelet kasları sadece güç üretimi, hareket ve nefes almadan sorumlu olmayıp enerji dengesi, glisemik kontrol ve metabolik homeostazın korunması gibi canlı yaşamını doğrudan ilgilendiren süreçlerde de kritik bir rol oynamaktadır. İskelet kaslarının bütünlüğünün korunması, günlük yaşamın sürdürülmesinin ötesinde insülin direnci, obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklardan korunma açısından son derece önemlidir (1, 2). Diğer yandan hareketsiz yaşam tarzı, immobilizasyon, denervasyon, yaşlanma, sepsis, kaşeksi, kanser, diyabet, böbrek ve kalp yetmezliği ile uzun süreli glukokortikoid kullanımı gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar iskelet kas kütlesi kaybına neden olur (3). Sonuç olarak, nedeni ne olursa olsun iskelet kas kütlesi kaybı yaşam kalitesini düşürüp, morbidite ve mortaliteyi artırdığı için kas atrofisinin engellenmesi son derece önemlidir (4, 5).

Glukokortikoidlerin gerek stres altındaki organizmada endojen olarak salınması, gerekse immünosupresif ve antiinflamatuvar özelliklerinden ötürü çok sayıda hastalığın tedavisinde eksojen olarak kullanılması nedeniyle, iskelet kası atrofisine yol açan koşullar arasında ayrı bir yeri vardır (6, 7). Sepsis, kaşeksi, açlık, metabolik asidoz ve ciddi insülinopeni gibi iskelet kası atrofisi ile karakterize birçok patolojik koşulda endojen glukokortikoid düzeylerinin arttığı bilinmektedir (8-10). İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, eksojen glukokortikoid verilmesinin iskelet kaslarında protein sentezini azaltırken, protein yıkımını da artırdığını ortaya koymaktadır (11, 12). Bununla birlikte, kas atrofisi sürecinde artan protein katabolizmasının, protein sentezindeki inhibisyona göre çok daha önemli rol oynadığı bildirilmiştir (13). Sağlıklı insanlara günlük 60 mg dozda üç gün süre ile uygulanan prednizolon tedavisi protein katabolizmasında hızlı bir artışa neden olmuştur (12). Sıçanlarda ise günde 0,6-1,2 mg/kg dozdaki deksametazon gastroknemius ve ekstansor digitorum longus kas ağırlıklarında henüz 3. günde %20'nin üzerinde bir azalmaya yol açmış ve katabolik etki 5. günde maksimum seviyelere yükselmiştir (14, 15).

Glukokortikoidler en çok reçete edilen ilaçlar arasında yer almakta olup, kullanımı tüm dünyada giderek artmaktadır (6, 7). Nitekim, 1990-2010 yılları arasında 3 aydan uzun süreli glukokortikoid kullanan hastaların sayısında %34'lük artış olduğu (16), Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 10 milyon yeni glukokortikoid reçetesi yazıldığı (17) bildirilmiştir. İlaç kaynaklı iskelet kası atrofisinin en yaygın nedeninin glukokortikoidler olduğu göz önüne alındığında (18), glukokortikoid nedeniyle oluşan iskelet kası atrofisinin önlenmesine yönelik stratejiler geliştirilmesi ciddi bir önem taşımaktadır. Kas atrofisinde rol oynayan sinyal yollarının benzerliği nedeniyle (19-22), glukokortikoid kaynaklı kas atrofisine ilişkin mekanizmaların aydınlatılması ve kas kütlesi kaybının önlenmesine ilişkin yaklaşımların geliştirilmesi; sarkopeni, kaşeksi, ekstremitte immobilizasyonu gibi birbirinden farklı koşulların yol açtığı kas atrofisinin önlenmesi konusunda da katkı sağlayacaktır.

İskelet kası atrofisi, bir çok molekülün birbiri ile etkileşim içerisinde olduğu kompleks sinyal yolları tarafından düzenlenir. Burada protein sentezinin temel yolağı olan IGF-1/Akt/mTOR yolağının anahtar elemanı protein kinaz B (Akt)'nin özel bir yeri vardır. Akt bir yandan protein sentezini tetikleyen mTOR'u aktive ederken, diğer yandan protein degradasyonunu başlatan FoxO transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek protein yıkımını azaltır (23). Gerçekten de, bir çok atrofi modelinde Akt fosforilasyonunun (p-Akt) azalmasına bağlı olarak FoxO transkripsiyon faktörlerinin üzerindeki baskının kalktığı ve özellikle FoxO3'ün çekirdeğe geçerek ubiquitin-proteazom sistemi (UPS) aktive ettiği, diğer bir deyişle iskelet kasları için proteolitik süreci başlattığı gösterilmiştir (24). Öte yandan, Akt genetik manipülasyon veya farmakolojik yolla aktive edildiğinde iskelet kası atrofisinin önlendiğinin gösterilmiş olması (25), İskelet kas kütlesini düzenleyen moleküler mekanizmalarda p-Akt'nin önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Genel olarak, iskelet kası atrofisinin önlenmesinde önerilen bir tedavi yöntemi olan egzersizin, protein sentez yolağını tetikleyip degradasyon yollarını baskılayarak kas protein sentezini arttırdığı bilinmektedir (26). Egzersizin, glukokortikoid kaynaklı kas atrofisinin önlenmesi veya azaltılmasında da etkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (27, 28). Egzersizin iskelet kaslarını atrofiden

korumasının altında yatan nedenlerden birinin de protein sentez ve degradasyon yollarının kesişim noktasında bulunan Akt'nın fosforilasyonunun olduğu bilinmesine karşın (29), bunu nasıl ve hangi koşullarda gerçekleştirdiği tam olarak aydınlatılmamıştır.

Organizma herhangi bir strese maruz kaldığında dolaşım, endokrin ve enerji sistemlerinin yeni koşullara adaptasyonunu sağlamada bir yanıt oluşturmasını beraberinde getirir. Hücresele düzeyde ise strese yanıt olarak protein döngüsündeki dengeyi bir grup proteinin koruduğu bilinmektedir. Bunlardan sıcak şoku proteinleri adı verilen bir protein ailesi (Hsp) sıcak, oksidan stres, asidoz, hipoksi ve hücre içi kalsiyum artışı gibi çeşitli stres koşullarında yeni sentezlenen ya da sentez sonrası stres koşullarına bağlı olarak, doğru katlanamayan proteinlerin dördüncül yapılarını oluşturması ve hücredeki hedef bölgelere taşınmasında son derece önemlidir (30-32). Bu proteinler içerisinde en iyi bilineni, 70kDa Hsp ailesinin indüklenbilir bir üyesi olan sıcak şoku proteini 72 (Hsp72)'dir. Egzersizle artan vücut sıcaklığına bağlı olarak indüklenen Hsp72'nin sıçan kalp kasını iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğu bilinmektedir (33). Benzer şekilde, kuyruktan asma yoluyla oluşturulan immobilizasyon modelinin öncesinde sıcak stres uygulanarak düzeyleri önceden artırılan Hsp72'nin soleus kasında immobilizasyon nedeniyle oluşan atrofiyi %50 oranında azalttığı (34), deksametazon kaynaklı sıçan ekstansör digitorium longus (EDL) kasında oluşan atrofide EDL kas enine kesit alanında meydana gelen küçülmeyi engellediği bildirilmiştir (35). İlginç olan Hsp72 düzeylerindeki artışın p-Akt düzeylerini koruduğunun gösterilmiş olmasıdır (36). Egzersizin, iskelet kası başta olmak üzere birçok dokuda Hsp72 düzeylerini artırması (33, 37, 38), glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisini engellenmesinin altında egzersiz ile indüklenen Hsp72'nin Akt üzerindeki etkisinin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bu nedenlerle bu çalışma; egzersizin glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisini engellemedeki rolünü Hsp72 ve kas protein sentez/degradasyon dengesi üzerinde temel rol oynayan Akt ve FoxO3 üzerinden değerlendirmek amacıyla planlanmıştır.

### **Hipotez 1**

Koşu bandında yapılan ve Hsp72 düzeylerinde artışa yol açan egzersizler, sıçan plantaris kasında deksametazon uygulamasıyla meydana gelen kas atrofisinin önlenmesine/azalmasına neden olur.

Bu hipotezi test etmek için beş günlük deksametazon uygulaması öncesi ve süresince, iskelet kasında Hsp72 indüklenmesine yol açan 25°C'lik ortam sıcaklığında veya Hsp72 artışının engellendiği 4-8°C'deki ortam sıcaklığında koşu egzersizine alınan sıçanlarda iskelet kas atrofisi, Hsp72 düzeyleri değerlendirilecektir. Buna göre, ve deksametazonun iskelet kasında yol açtığı atrofi Hsp72 düzeylerinin artmadığı 4-8°C'deki ortam sıcaklığında yapılan egzersiz grubunda önlenemez/azaltılamaz iken, 25°C'lik ortam sıcaklığında yapılan egzersizlerde Hsp72 düzeylerinin artması ve iskelet kası atrofisinin önlenmesi veya azalmasının gözlenmesi hipotezimizin kabul edildiğini gösterecektir.

### **Hipotez 2**

25°C'lik normal ortam sıcaklığında yapılan egzersiz p-Akt düzeyleri ile sitozolik fosforile FoxO3 (p-FoxO3) düzeylerinin artışına/korunmasına neden olur.

Buna göre, deksametazon enjeksiyonu ile birlikte p-Akt ve sitozolik p-FoxO3 düzeylerinde meydana gelecek olan azalmada 4-8°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yapan grupta bir değişiklik gözlenmezken 25°C'lik normal ortam sıcaklığında egzersiz yapan grupta p-Akt ve sitozolik p-FoxO3 azalmanın önlenmesi bu hipotezimizin desteklendiğini gösterecektir.

Böylece, deksametazon enjeksiyonu öncesinde egzersize başlayan gruplardan soğuk ortamda (4-8°C) egzersiz yapan hayvanların plantaris kasında Hsp72 indüklenmesi gerçekleşmeyecek ve beş günlük deksametazon enjeksiyonu sonunda p-Akt ve sitozolik p-FoxO3 düzeylerinde azalma ve kas atrofisi meydana gelecektir. 25°C'lik normal ortam sıcaklığında egzersiz yapan sıçanların plantaris kasında ise Hsp72 düzeyleri artacak, deksametazon uygulamasının yol açtığı p-Akt ve sitozolik p-FoxO3 düzeylerindeki azalma ile plantaris kas atrofisi önlenecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

İnsan vücudundaki en büyük doku olan iskelet kasları yalnızca güç üretimi, postürün korunması ve nefes almadan sorumlu olmayıp aynı zamanda; metabolik homeostazın korunması, glisemik kontrolün sağlanması ve metabolik genlerin regülasyonunda son derece ciddi bir öneme sahiptirler (2, 39, 40). Bu nedenlerle sağlıklı bir kas kütleline sahip olmak insülin direnci, obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklardan korunma açısından son derece önemlidir (1).

Yüksek plastisiteye sahip olan iskelet kasları maruz kaldığı çevresel ya da fizyolojik streslere, kendini korumak ve organizmanın ihtiyaçlarını en verimli şekilde karşılayabilmek için kas lif çapını artırarak ya da kas lif çapını azaltarak yanıt verir. Egzersiz, dallı zincirli aminoasitler ve bazı sentetik anabolik steroidlerin kullanımı, iskelet kası protein sentezini artırarak lif çapında büyüme ve hipertrofiye neden olurken (41); immobilizasyon, denervasyon, yüksüzleştirme, yaşlanma gibi koşullar iskelet kasında protein degradasyon sürecini hızlandırarak atrofiye neden olur (42).

İmmünosupresif ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle bazı hastalıkların tedavisinde, organ transplantasyonu (43) ya da omurilik yaralanmaları (44) gibi kritik durumlarda kullanılan veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı (45) sepsis (46) AIDS (47), kanser (48), böbrek (49) ve kronik kalp yetmezliği (50) gibi patolojik koşullara yanıt olarak salınan glukokortikoidler, kas proteinlerinin özellikle miyofibriler proteinlerin hızla degradasyonunu beraberinde getirerek periferik ve solunum kaslarında atrofiye neden olur. Öte yandan, glukokortikoid kullanımının iskelet kaslarında atrofiye neden olması yaşam kalitesini olumsuz etkileyerek morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde artırır.

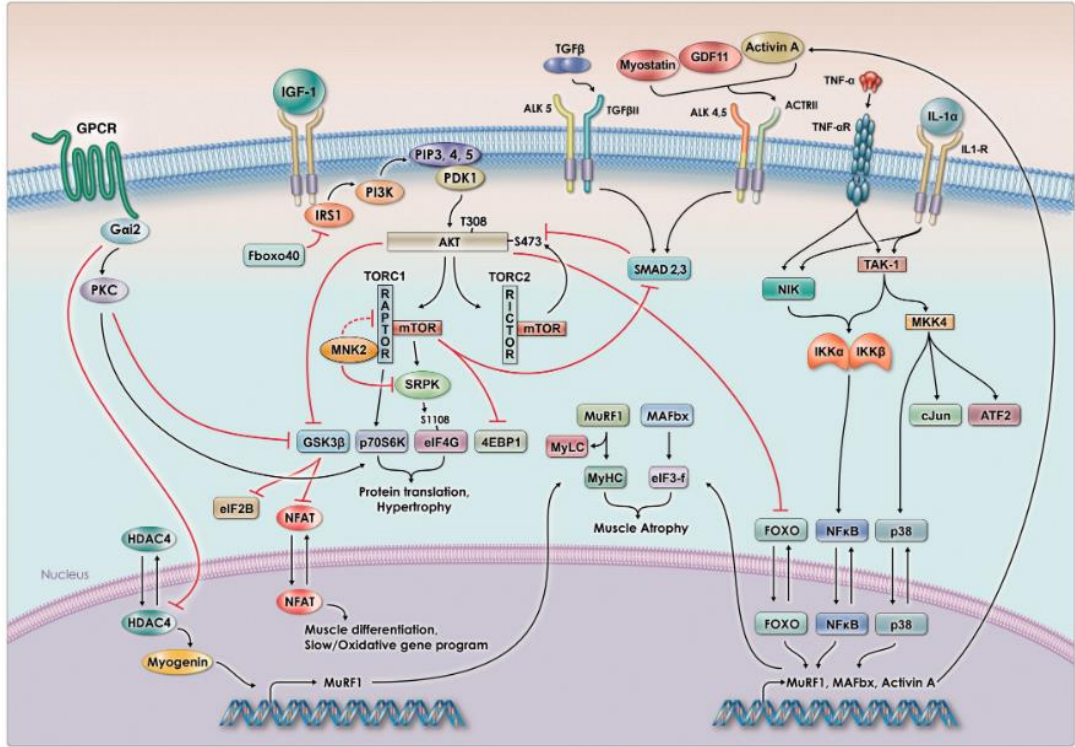
Son yıllarda glukokortikoidler dünya genelinde en çok reçete edilen ilaçlar arasında yer almakta ve kullanımının giderek arttığı görülmektedir (6, 7). Gerçekten de, 1990-2010 yılları arasında 3 aydan uzun süreli glukokortikoid kullanan hastaların sayısında %34'lük artış olduğu (6, 16), Amerika Birleşik Devletleri'nde neredeyse 2,5 milyon hastanın oral glukokortikoid tedavisine ihtiyaç duyduğu ve bu hastaların üçte birine 5 yıldan uzun bir süre tedavi uygulandığı (51) bilinmekle birlikte, her yıl 10

milyon yeni glukokortikoid reçetesinin yazılıyor olması hatırı sayılır bir hasta popülasyonun glukokortikoidlere maruz kaldığını göstermektedir (17).

Glukokortikoidler nedeniyle oluşan iskelet kası atrofisinin önlenmesine yönelik ilaç ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ciddi bir önem taşımaktadır. Benzer şekilde, iskelet kas atrofisinde rol oynayan sinyal yollarının benzerliği nedeniyle (19-22) glukokortikoidlerin yol açtığı kas atrofisine ilişkin mekanizmaların aydınlatılması ve kas kütlesi kaybının önlenmesine ilişkin yaklaşımların geliştirilmesi; sarkopeni, kaşeksi, ekstremitte, immobilizasyonu gibi birbirinden farklı koşulların yol açtığı kas atrofisinin önlenmesi konusunda da katkı sağlayacaktır.

Normal koşullarda iskelet kası protein sentez ve degradasyonu bir denge durumundadır (40). Bu dengenin protein sentezinin artması veya yıkımının azalması yönünde değişmesi kas kütlesinde artışa yol açarken, sentezin azalması ve/veya protein degradasyonunun artması dengeyi iskelet kas kütlesi kaybına doğru çevirmektedir. Fizyolojik düzeyde kas kütlesinde artış veya azalma şeklinde görülen bu adaptasyon, hücresel boyutta protein sentez ve protein degradasyon yollarının karşılıklı iletişimi sonucu iskelet kası protein döngüsünün düzenlenmesiyle gerçekleşir. Bu iletişimin sonucunda protein sentezi artar ve degradasyon azalırsa kas liflerinde adaptasyonun gözle görülebilen en somut hali olan hipertrofi meydana gelirken, sentezin azalması ve degradasyonun artması sonucunda kas atrofisi gözlenir.

İskelet kas hücresinde protein sentez ve degradasyonu iki temel sinyal yolağı tarafından düzenlenmektedir. Bunlardan insulin benzeri büyüme faktörü1–fosfatidilinozitol-3-kinaz–Akt–rapamisin kompleksinin memeli hedefi (IGF1–PI3K–Akt–mTOR) sentez yolağını kontrol ederken, dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ailesinin bir elemanı olan miyostatin yolağı ise iskelet kası protein sentezinin negatif regülatörü olarak görev yapar (Şekil 2.1) ve sentezi baskılar (52). Protein degradasyonu ise kalsiyum bağımlı sistem olan kalpain-kaspazlar, lizozomal proteoliz ve UPS başta olmak üzere genellikle birçok sistemin eş zamanlı çalışmasıyla gerçekleşir.



Şekil 2.1. İskelet kası protein sentez ve degradasyon yolları (53).

## 2.1. Protein Sentez Yolağı

Son yıllarda sayısı giderek artan çalışmalarla, protein sentezinin farklı sinyal molekülleri ve yollarının aktivasyonu ile gerçekleştirilebileceği gösterilmiş olsa da (54, 55), iskelet kası protein sentezinin temel düzenleyicisi halen IGF-1 sinyal yolağı olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.1). Hücre zarında bulunan reseptörüne bağlandıktan sonra IGF-1, PI3K'yi aktive ederek senteze ilişkin sinyalin hücre içerisine aktarılmasını ve protein sentezinin aktivasyonunu sağlar. PI3K'in aktivasyonu sırasıyla, sinyal yolağının alt basamağında bulunan Akt ve mTOR'un fosforilasyonunu artırarak protein sentezini hızlandırır (23). IGF-1'in protein sentezi üzerindeki pozitif rolü bir çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma ile ortaya konmuştur (23). Örneğin, IGF-1 verilen iskelet kası hücrelerinde p-Akt düzeyleri artmış ve bu artışa miyotüp çaplarındaki artış da eşlik etmiştir (56). Benzer şekilde, iskelet kasına özgü IGF-1 izoformunun sürekli olarak arttığı transgenik farelerin iskelet kas kuvvetlerinin ve kütlelerinin aynı batında doğmuş olanlarına (wild type) göre daha fazla olduğu, dahası normal farelerin kas kütleleri yaşla birlikte azalırken IGF-1 transgenik farelerin kas kütlelerinin korunduğu



bildirilmiştir (57). IGF1–PI3K–Akt–mTOR protein sentez yolağının ana regülatörünün Akt olduğu bilinmektedir. Öyle ki, kasa spesifik IGF-1 reseptörünün inhibe edildiği farelerde, sinerjist kasın çıkarılmasının IGF-1 sinyali olmamasına rağmen plantaris kasında Akt fosforilasyonunun arttığı ve buna bağlı olarak hipertrofi oluşturduğu gösterilmiştir (58). Akt'nin iskelet kası protein döngüsündeki rolü yalnızca sentez yolağındaki bir sonraki ana molekül olan mTOR'u aktive ederek protein sentez hızını artırmakla sınırlı değildir. Akt aynı zamanda protein degradasyon yolağında bulunan FoxO (Forkhead Box) transkripsiyon faktörlerinin çekirdeğe geçerek DNA üzerinde kendine özgü bulunan bölgeye bağlanmasını ve atrofi ile ilgili genlerin ekspresyonunu artırmasını engeller, başka bir deyişle aktivasyonunu regüle eder (59).

## **2.2. Protein Degradasyon Yolağı Ubikütin Proteozom Sistem**

Ökaryotik hücrelerde protein degradasyonu temel olarak, ubikütin proteozom sistemi aracılığıyla veya ötofaji-lizozom sistemi aracılığı ile gerçekleşmektedir. Ötofaji-lizozom özellikle hasarlı organellerin ve bazı proteinlerin degradasyonundan sorumlu olup, hücre içi homeostazi korumak için yapısal olarak bozulmuş ya da işlevini kaybetmiş organelleri ve proteinleri lizozomlar aracılığı ile aminoasitlerine kadar parçalayarak ihtiyaç durumunda sentez için yeniden kullanılmasını sağlar (60). Diğer taraftan, UPS ise daha çok myofibriller proteinler gibi yarı ömürleri uzun olmayan (61) proteinlerin degradasyonundan sorumludur ve yıkılacak proteinleri belirlenmesi için MuRF1 ve MAFbx gibi UPS'de görev alan ligaz enzimleri aracılığı ile proteinlerin yan zincirlerine kovalent bir bağ ile "ubikütin" adı verilen bir polipeptit ekler. Daha sonra ubikütilenen proteinler degradasyona uğramaları için proteazın katalitik bölgesine taşınırlar ve polipeptitlere parçalanarak tekrar kullanılmak üzere hücrenin aminoasit havuzuna aktarılırlar (62). Protein degradasyonunda iki temel sistem olan UPS ve lizozomal proteolizin yanı sıra, kalsiyum bağımlı kalpainler (63), katepsinler (64) gibi bir çok yardımcı sistem atrofi sürecine dahil olsa da, asıl rolün UPS'ye ait olduğu kabul edilmektedir (65, 66).

İskelet kasları yüksek plastisiteye sahip olmaları nedeniyle, immobilizasyon, yüksüzleştirme ya da uzun süreli glukokortikoid kullanımı gibi atrofiye neden olan

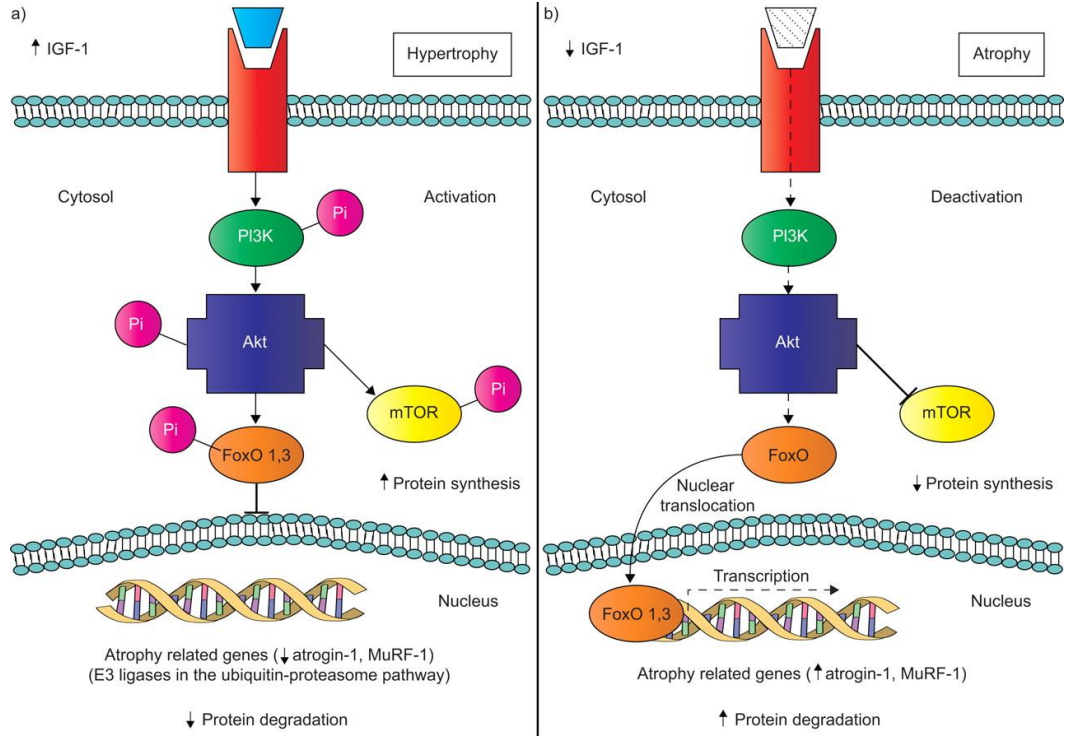
durumla karşı karşıya geldiğinde hücre içerisinde protein degradasyon yollarını aktifleşerek ilgili genlerin ekspresyonunu artırır. Böylece, hücrenin değişen koşullara uyum sağlanması için proteolitik süreç başlamış olur. Genel olarak iskelet kaslarında atrofinin son aşamasında aktive olan bu genler “atrojenler” olarak adlandırılırlar ve miyofibriler proteinleri degrade ederek kasın kontraktıl proteinlerinde azalmaya yol açarlar (67).

İskelet kasında temel atrojenler ubiquitin ligazlardan MurF1 (muscle ring finger-1) ve MAFbx (muscle atrophy F-box, atrogen-1) FoxO transkripsiyon faktörlerinin hedef genleridir. Sitoplazmada fosforile formda bulunan FoxO'nun çekirdeğe translokasyonu molekülün defosforile olması ile mümkündür. FoxO'nun defosforile olarak çekirdeğe geçmesi ile MuR1 ve MAFbx'nin ekspresyonları artar (Şekil 2.2).

mTOR'un ve FoxO'nun regülasyonunda doğrudan rol oynayan, protein sentezi kadar protein degradasyonu yolağında da son derece önemli olan Akt fosforilasyonunun, iskelet kasında FoxO3'ün sitozoldeki fosforile formunun korunmasını, dolayısıyla çekirdeğe geçişlerini engelleyerek atrofi yolağının baskılanmasını sağlar. Diğer yandan, atrofiye neden olan farklı koşullarda p-Akt düzeylerindeki azalma, Akt'nin FoxO üzerindeki kontrolünün azalmasına, böylece defosforile olan FoxO transkripsiyon faktörlerinin sitozolden çekirdeğe geçmesine yol açar. Böylece atrojenlerin ekspresyonları artar ve sonuç olarak UPS aktivasyonu üzerinden kas atrofisi meydana gelir (68). Miyostatinin kas protein sentezinin negatif regülatörü olduğundan yukarıda söz edilmişti. Miyostatin bu düzenlemeyi, Smad2/3 (mothers against decapentaplegic homolog)'ü aktive ederek gerçekleştirir. Fosforilasyonundaki artışla aktive olan Smad2/3, Akt fosforilasyonunu baskılayarak, Akt'nin FoxO transkripsiyon faktörleri üzerindeki fosforilasyonunu azaltır ve böylece özellikle FoxO3 olmak üzere defosforile FoxO çekirdeğe geçerek atrojenlerin gen ekspresyonunu başlatır.

Hücre kültürü ve hayvan çalışmaları, iskelet kası atrofisinden MurF1 ve MAFbx düzeylerindeki artışın sorumlu olduğunu göstermektedir (69). Nitekim, transfeksiyon yolu ile FoxO3'ün sürekli olarak defosforile kalması, kas hücrelerinde MAFbx

ekspresyonunun 6 kat artışına yol açmış, 24 saat sonunda da miyotüp çaplarında yarı yarıya azalma görülmüştür. Aynı çalışmada hücre ortamına glukokortikoid verildiğinde, p-Akt düzeylerini ve buna bağlı olarak FoxO fosforilasyonu azaltarak MAFbx ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (70).



**Şekil 2.2.** Akt'nin FoxO transkripsiyon faktörlerini düzenlemesi (71).

### 2.3. Glukokortikodiler ve Fizyolojik Etkileri

Organizma maruz kaldığı çevresel ya da fizyolojik streslere merkezi sinir sistemi ile endokrin, bağışıklık ve kardiyovasküler sistemler gibi periferel sistemlerin kompleks etkileşimi ile yanıt verir. Fizyolojide strese yanıt nöroendokrin sistemin temel bir elemanı olan hipotalamus, hipofiz bezi ve adrenal korteksten oluşan (HPA aksı) bir sistemle düzenlenir (72). Özellikle strese karşı uzun dönem yanıtta sırasıyla önce hipotalamustan kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salınır. CRH ise hipofiz bezinden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınmasına neden olur. ACTH dolaşıma geçerek kan yoluyla adrenal bezlere ulaşır ve buradan insanlarda kortizol, kemirgenlerde ise kortikosteron adı verilen glukokortikoidlerin salınımını uyarır (73). Sıcaklık artışı, yoğun egzersiz ve hipoksi gibi çeşitli koşullar organizmada stres yanıtı

oluşmasına neden olur. Organizmada hemen hemen her dokuda bulunan glukokortikoid reseptörü, kortizolün bağışıklık, kardiyovasküler, sinir ve kas-iskelet sistemi de dahil olmak üzere bütün sistemler üzerinde etki göstermesini sağlar. Organizmanın kortizole verdiği fizyolojik yanıtların başında immün sistemin baskılanması, katekolamin salınımı, insülinin baskılanması ve enerji depolarının mobilizasyonu gelmektedir. Ancak glukokortikoidin kelime anlamına bakıldığında da glukoz ve adrenal korteksten salınan steroid kelimelerinin birleşimi olduğu, kısaca glukoz metabolizmasında rol oynayan steroid anlamına geldiği görülmektedir. Başka bir deyişle, glukokortikoidlerin organizmada oynadığı temel rol stres altındaki organizmanın enerji ihtiyacını karşılayabilmek için başta triaşilgliserolden elde edeceği gliserol ve proteinlerden elde edeceği aminoasitler olmak üzere, karaciğerin glukoneogenez için gereksinim duyduğu substratları elde etmektir. Bu durum kendini iskelet kaslarında protein degradasyonunun artmasına neden olarak gösterir (74).

### **2.3.1. Glukokortikoidler ve İskelet Kas Atrofisi**

Glukokortikoidler hidrofobik yapıda olduklarından hücre membranından kolaylıkla geçer ve sitoplazmada bulunan reseptörlerine (GR) bağlanarak ligand-GR kompleksini oluşturur. Bu kompleks çekirdeğe geçerek hedef genlerin promotor bölgesinde bulunan hormon yanıt elemanına (HRE) bağlanır ve gen ekspresyonunu regüle eder. Organizmada belirli bir düzeyin üzerindeki endojen ya da eksojen glukokortikoid, kas proteinlerinin degradasyonunda artış ve mitokondriyal disfonksiyona neden olarak kas kuvvetinde azalma ve atrofi ile karakterize bir duruma yol açar (Dirks-Naylor, 2009; Liu, 2016).

Anti-anabolik ve katabolik özelliklere sahip oldukları bilinen deksametazon, prednizolon ve betametazon gibi glukokortikoidlerin eksojen kullanımı ilaca bağlı gelişen iskelet kas atrofisinin en yaygın nedenidir (Fappi, 2019). Nitekim, insanlarda kısa süreyle uygulanan prednizolon tedavisinin protein katabolizmasında artışa neden olduğu, deksametazon verilen sıçanlarda ise yalnızca 3. günde gastroknemius ve ekstansör digitorum longus kas ağırlıklarında %20'nin üzerinde bir azalmanın görüldüğü bildirilmiştir (12, 14). Glukokortikoidlerin katabolik etkisinin altında, IGF-

1/Akt/mTOR protein sentez yolağındaki Akt ve mTOR'un fosforilasyonunu engelleyerek anabolizmayı inhibe etmeleri ve dolaylı olarak FoxO üzerinden UPS'yi aktive etmeleri yatmaktadır. Örneğin, deksametazon verilen kas hücrelerinde Akt ve dolayısıyla FoxO3'ün fosforilasyonu azalmış ve FoxO3'ün transkripsiyonel aktivitesinde artış görülmüştür. Benzer şekilde deksametazon, kas hücrelerinde FoxO3'ün defosforile olarak çekirdeğe geçmesine, MAFbx ve MurF1 ekspresyonlarını artırarak miyotüp çaplarında küçülmeye neden olmuştur (75). Hücre kültüründe transfeksiyon yolu ile Akt fosforilasyonun devamlı hale getirilmesi, ortama deksametazon verilmesine rağmen MAFbx ve MurF1 ekspresyonunu inhibe ederek miyotüp çapındaki azalmayı engellemiş (76) ve glukokortikoidle oluşan iskelet kas atrofisinde Akt'nin rolünü ortaya koymuştur.

#### **2.4. Sıcak Şoku Proteini (Hsp72) ve İskelet Kas Atrofisi**

Sıcak şoku proteinleri (Hsp) tüm canlılarda yapısal olarak var olan ve evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş proteinlerdir (77). Bu proteinler hücrel homeostazın korunmasında, polipeptidlerin doğru katlanmasında ve şaperon olarak yeni sentezlenen proteinlerin hasara uğramadan hücrel lokalizasyonlarına ulaştırılmasında veya yanlış katlanmış proteinlerin tekrar katlanmalarına ve hasarlı proteinlerin degrade edilerek hücrede birikmelerinin engellenmesinde önemli bir rol üstlenirler. Başlangıçta, organizmada yalnızca artan sıcaklığa bağlı olarak indüklendiğine inanıldığı için sıcak şoku proteinleri olarak adlandırılan bu proteinlerin düzeyleri; hipoksi, oksidatif stres, asidoz, hücre içi kalsiyum artışı, enerji veren substratlarda azalma gibi çeşitli koşullarda hızla artmakta (30, 31) ve daha sonra ortaya çıkan farklı stresler karşısında hücre ve dokuda koruma sağlamaktadır (78).

Moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılan Hsp'lerin en iyi bilinenleri, Hsp70 gen ailesi tarafından kodlanan ve bakteriden insana kadar tüm canlı organizmalarda var olan üyelerdir. Bu ailenin göze çarpan iki üyesinden biri yapısal olarak bulunan Hsp73, diğeri ise 72kDa moleküler ağırlığa sahip ve strese yanıt olarak indüklenen formu olan Hsp72'dir. Hsp72 hücre korumasında görev alan temel sıcak şoku proteini

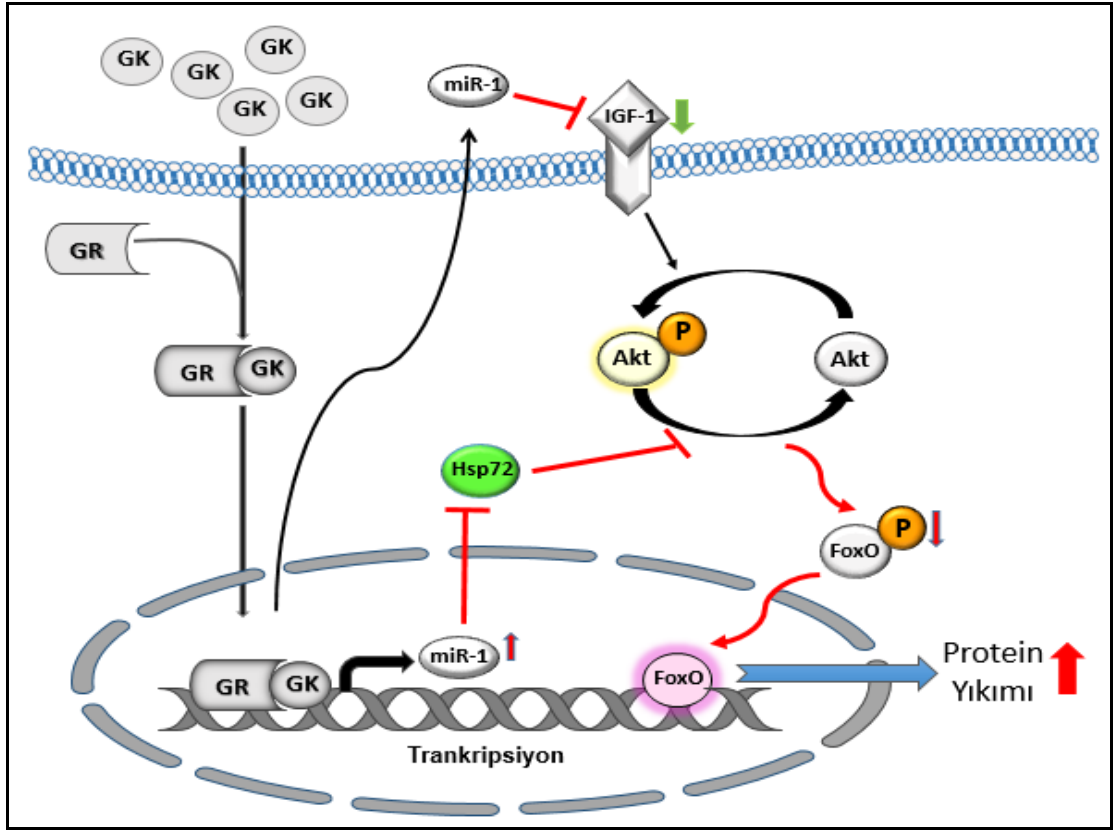
olup, hücre ve dokuyu sıcak stresi ve kontraksiyona bağlı hasar dahil olmak üzere farklı streslere karşı korumaktadır (79).

Hsp72'nin hücreyi ölümcül streslere karşı koruduğunun gösterildiği ilk çalışmalardan birinde, egzersiz ve sıcak stresi yolu ile kalp kasında önceden Hsp72 düzeyleri artılan sıçanların, önceden Hsp72 indüklenmemiş gruba göre kalpte oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarından daha fazla korunduğu ortaya konmuştur (33). Önceden indüklenen Hsp72'nin iskelet kaslarını atrofiden koruyabileceğine ilişkin tasarlanan ilk çalışmalardan biri ise, sıcak stresi yoluyla indüklenen Hsp72'nin kuyruktan asma gibi bir yüksüzleştirme modelinde meydana gelen soleus kası atrofisini önemli ölçüde engellediğini göstermektedir (34). Benzer şekilde, Hsp72 indüksiyonunun sıçan iskelet kasını immobilizasyon veya denervasyon atrofisinden koruduğu bildirilmiştir (80). Hayvanda tüm vücuda uygulanan sıcak stresi yoluyla Hsp72 düzeylerinin artırılması, diyafram kasında kullanmamaya bağlı hızla gelişen atrofiyi önlemiştir (81). Her ne kadar bu çalışmalar atrofinin Hsp72 üzerinden engellendiğinin doğrudan bir kanıtı olmasa da, plasmid aracılığıyla sıçan soleus kasında Hsp72 aşırı ekspresyonunun 7 günlük immobilizasyonun neden olduğu protein yıkım yolağı moleküllerinin aktivasyonunu baskılaması ve kas atrofisini engellemesi Hsp72'nin iskelet kası atrofisini önleyebileceğinin önemli bir göstergesidir (80).

#### **2.4.1. Glukokortikoid Kaynaklı Kas Atrofisi ve Hsp72**

Glukokortikoid kaynaklı kas atrofisi koşullarında Hsp72'nin koruyucu rolüne ilişkin moleküler mekanizmaların araştırıldığı çalışmalar diğer atrofi koşullarındaki bulguları destekler niteliktedir. Örneğin, kas hücrelerine deksametazonla birlikte bir Hsp72 indükleyicisi olan selastrol de verildiğinde, deksametazon nedeniyle azaldığı bilinen p-Akt ve p-FoxO3 düzeylerinin korunduğu ve hücre çaplarındaki azalışın engellendiği bildirilmiştir (82). Dahası, deksametazon verilen sıçanlarda sıcak stresi yoluyla artırılan Hsp72 düzeylerinin MAFbx ve MuRF1 gen ekspresyonundaki artışı engellediği ve kas enine kesit alanındaki düşüşü tersine çevirerek atrofiyi önlediği gösterilmiştir (35). Bu bulguyu destekleyen bir başka *in vitro* çalışmada ise,

deksametazon verilen kas hücrelerine sıcak stres uygulandığında, protein sentez yolağının anahtar molekülü olan p-Akt düzeylerinin korunduğu ve FoxO3a defosforilasyonunun engellenerek (Şekil 2.3.) miyotüp çapındaki düşüşün önlendiğini göstermiştir (83).



**Şekil 2.3.** Glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisinin moleküler mekanizması.

Glukokortikoidler sitoplazmadaki reseptörüne bağlandıktan sonra çekirdeğe geçerek miR-1 üzerinden Hsp72 düzeylerini azaltır. Hsp72, Akt'nin fosforile formunda (p-Akt) kalmasını sağladığı için azalan Hsp72 bir yandan Akt fosforilasyonunu azaltırken, diğer yandan glukokortikoidlerin daha fazla GR'ye bağlanarak çekirdeğe geçmesine neden olur. Akt fosforilasyonunun yeteri düzeyde olmayışı FoxO'nun defosforile olarak çekirdeğe geçişini ve böylece atrofiye ilişkin genlerin ekspresyonu ve protein yıkımını artırır.

Glukokortikoidlerin protein sentez yolağında olduğu kadar protein degradasyon yolağında da kilit rol oynayan Akt'nin fosforilasyonunu azaltıp, protein degradasyonunda rol oynayan MuRF1 ve MAFbx'i aktive etmesinin yanı sıra, proteinlerin düzenlenmesinde rol alan mikroRNA (miRNA)'lardan kasa spesifik

miR1'in ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir (Şekil 2.3). Kukreti ve diğerlerinin (36), glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisi hücresel mekanizmalarında Hsp72'nin yerini araştırdıkları çalışmada, miR1'in iskelet kasında Hsp72 düzeylerinin azalmasına yol açtığını ve bu durumun daha fazla miktarda glukokortikoid reseptörünün çekirdeğe transloke olmasına neden olduğunu dolayısıyla buna bağlı transkripsiyonel aktivitede artış görüldüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada Hsp72'deki azalmanın p-Akt düzeylerinin azalmasına da neden olduğu belirtilmiştir (36). Bu bulguyu destekler nitelikte olan başka bir çalışmada ise Hsp72'nin GR üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğu ve Hsp72 ile bağlandığında GR'nin çekirdeğe translokasyonun azalmasıyla transkripsiyonel aktivitesinin baskılandığı bildirilmiştir (84). Tüm bu çalışmalar bize glukokortikoid kaynaklı iskelet kas atrofisini önlemede de Hsp72'nin rolü olduğunu göstermektedir.

## 2.5. Egzersizin İskelet Kas Atrofisini Önlemedeki Rolü

Egzersiz, iskelet kası atrofisinin önlenmesinde en etkili yöntem olarak kabul edilmektedir (85). Her ne kadar egzersizin kas atrofisi üzerindeki koruyucu etkisini iskelet kaslarında protein sentez ve degradasyon yollarında rol alan bazı sinyal moleküllerini aktive/inhibe ederek gösterdiği bilinse de (26), egzersizin kas kütlesini düzenleyen moleküler mekanizmalar üzerindeki etkisi halen tam anlamıyla açığa kavuşturulamamıştır.

Organizmanın fizyolojik bir stres uyararı olan egzersize uyum sağlaması, sonrasında çeşitli patolojik ve çevresel nedenler ile oluşabilecek iskelet kası atrofisinden korunmasını sağlar. Bu çerçevede glukokortikoid kaynaklı kas atrofisinin engellenmesinde egzersizin önemini gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte, bu etkiyi nasıl gösterdiği net olarak bilinmemektedir. Bu alandaki ilk çalışmaların birinde, motorize koşu bandında haftada 5 gün 12 hafta süresince, hızı ve süresi giderek artarak son 4 haftada 28 m/dk hız ve günde iki saat süreye ulaşan bir egzersiz protokolü ile antrene edilen sıçanların plantaris ve gastroknemius kaslarının glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisinden korunduğu gösterilmiştir (86). Gerçekten de, gerek aerobik koşu egzersizleri gerekse tırmanma tipi direnç



egzersizlerinin (27) glukokortikoid veya yüksüzleştirme kaynaklı atrofi modellerinde, protein sentezi ve yıkım yollarının regülasyonu yoluyla iskelet kaslarını, atrofiden koruduğu ortaya konmuştur (87).

Egzersiz, iskelet kası protein döngüsünü kontrol eden sentez ve degradasyon yollarında kilit rol oynayan Akt'nin fosforilasyonunu artırır. Örneğin, insanda direnç ve dayanıklılık egzersizlerinin protein sentez yolağı üzerindeki akut etkilerinin incelendiğı bir çalışmada, her iki tür egzersizin de egzersiz bitiminden itibaren 30 dakika içerisinde vastus lateralis kasında Akt fosforilasyonunu iki kat artırdığı gösterilmiştir. (29). Buna paralel olarak egzersiz FoxO'nun defosforilasyonunu, dolayısıyla çekirdeğe geçişini ve UPS'yi aktive ederek iskelet kası protein döngüsünün degradasyon lehine döndürmesini engellemektedir (88, 89). Böylece egzersiz sentez ve degradasyon yollarındaki moleküllerin aktivasyonlarını değiştirerek, atrofiye yol açan koşullarda yıkım yönünde bozulan protein yapım/yıkım dengesinin yeniden kurulmasını sağlar.

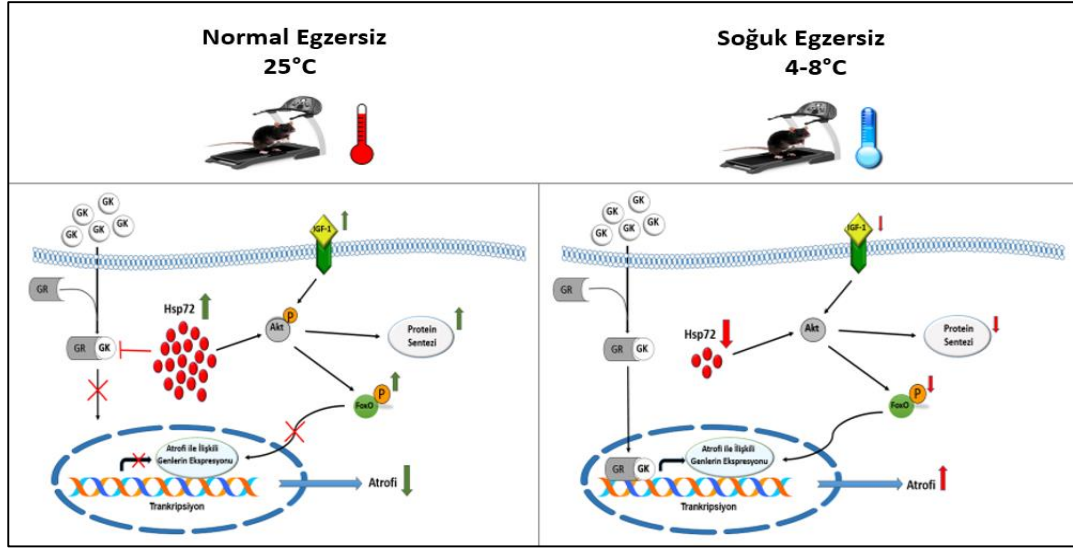
### **2.5.1. Egzersiz ile İndüklenen Hsp72**

Koşu egzersizleri sırasında iskelet kas hücresinde sıcaklık artışı, glikojen depolarının azalması, pH azalması, ve sitozolik kalsiyum konsantrasyonundaki artış gibi Hsp72 indüksiyonuna neden olan stres koşullarının neredeyse tamamı meydana gelir (90, 91). Bu stres koşulları arasında özellikle vücut sıcaklığındaki artışın Hsp72 indüksiyonu açısından özel bir yeri vardır. Nitekim Ruell ve diğerleri (92) Hsp72 indüksiyonunun, tüm vücuda değışen süre ve derecelerde uygulanan sıcak stres nedeniyle vücut sıcaklığının 40°C ve üzerine ulaştığında gerçekleştiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, 30 m/dk hızda, 60 dk süren koşu egzersizi sonrası sıçanların vücut sıcaklıklarının 40°C'nin üzerine çıkması, adrenal bez, iskelet kası ve plazmada Hsp72 indüksiyonuna neden olmuştur. Diğer taraftan, vücut sıcaklığındaki artışın engellendiğı ortam ısısı olan 4-12°C' de egzersiz yaptırılan hayvanların çoğu dokusunda Hsp72 indüksiyonunun engellendiğı gösterilmiştir (37, 38, 93). Egzersizin ve iskelet kas atrofisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, iki haftalık kuyruktan asma yolu ile oluşturulan yüksüzleştirme modeli uygulanan sıçanlara, modelin ikinci

haftasında günde 40 dakika %60  $VO_{2max}$ 'a denk gelecek aerobik egzersiz eklenmesi soleus kasında Hsp72 düzeylerini ve Akt fosforilasyonunu artırarak yüksüzleştirmenin yol açtığı kas atrofisini önemli ölçüde geri çevirmiştir (94).

Butün bu bulgular bize egzersizde vücut sıcaklığına bağlı olarak artan Hsp72 ile iskelet kas protein döngüsünün merkezinde yer alan Akt arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Gerçekten de, sıçanlarda vücut sıcaklığı artışının engellenmesiyle Hsp72'nin indüklenmediği bilinen 4°C'lik ortamda yaptırılan koşu egzersizinde Akt fosforilasyonu gerçekleşmezken, sıçanlar için doğal sıcaklık kabul edilen 25°C'de egzersiz yapan grubun gastroknemius kasında egzersizden hemen sonra Akt fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir (95). Egzersizden bağımsız olarak sıcak stresi, gen transferi ya da farmakolojik yolla Hsp72 indüksiyonunun farklı atrofi modellerinde iskelet kası kaybını önlediğini de göz önüne alacak olursak, kas atrofisinin önlenmesinde bilinen en etkili yöntem olan egzersizin bu etkisini artan Hsp72 düzeyleri üzerinden gerçekleştirmiş olabileceği görüşü ağırlık kazanmaktadır.

Yukarıda tartışılan bütün bu literatür bulguları egzersizin glukokortikoid kaynaklı kas atrofisini Hsp72 üzerinden gerçekleştiriyor olacağını düşündürmektedir. Glukokortikoid enjeksiyonu yapılan sıçanlarda Hsp72'nin indüklenebileceği veya indüklenemeyeceği iki farklı ortam sıcaklığında aynı süre ve şiddette gerçekleştirilecek koşu egzersizlerinin iskelet kası atrofisi üzerine etkisinin araştırılması, egzersizin bu etkisini sıcak stresi ile indüklenen Hsp72 üzerinden yapıp yapmadığı konusunu aydınlatmamızı sağlayacaktır. Böylece bu tez çalışmasıyla glukokortikoid kaynaklı kas atrofisinin önlenmesinde egzersizin rolünün protein sentez/degradasyon sinyal yollarındaki moleküller ve Hsp72 üzerinden aydınlatılması planlanmıştır. Şekil 2.4.'te bu çalışmada ortaya atılan hipotez şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 2.4.** Vücut sıcaklığının arttığı ve artmadığı egzersiz koşullarında, glukokortikoid kaynaklı kas atrofisinin moleküler mekanizması.

Buna göre, oda sıcaklığında yapılan koşu egzersizleri Hsp72 düzeylerinin artmasına neden olacaktır. Artan Hsp72 düzeyleri p-Akt düzeylerini koruyacağı için FoxO fosforilasyonu korunacak ve atrofi ile ilgili genlerin transkripsiyonu, dolayısıyla protein degradasyonu engellenmiş olacaktır. Ayrıca, oda sıcaklığında yapılan egzersizle düzeyleri artan Hsp72, glukokortikoidlerin reseptörle bağlanmasını da engelleyeceği için atrofi ile ilgili genlerin glukokortikoidler tarafından aktivasyonu da baskılanmış olacaktır. Soğuk ortamda yapılan egzersizlerde ise Hsp72 düzeylerini artırmayacağı için p-Akt ve dolayısı ile p-FoxO3 düzeylerinde azalma ile protein degradasyonu ve kas atrofisinin görülmesi engellenemeyecektir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırma Grubu

Bu çalışmanın etik onayı Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından alınmıştır (2019/04-05). Kırksekiz adet 3-4 aylık dişi Sprague Dawley sıçan deney protokollerinin başlangıcından önce 12/12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, her kafeste 2 hayvan olacak şekilde bir hafta süreyle barındırılarak ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Hayvanlar adaptasyon süreci dahil olmak üzere deney protokollerini süresince 22-23°C oda sıcaklığında ve %50-60 nem olan ortamda barındırılmıştır. Deney protokollerini süresince hayvanların beslenmeleri için serbest şekilde ulaşabildikleri miktarda standart yem (%5,1 yağ, %22,5 protein) ve su verilmiştir. Adaptasyon sürecinden sonra hayvanlar egzersiz ve deksametazon uygulamaları için aşağıdaki gruplara ayrılmıştır.

#### 3.2. Deney Grupları

1) Kontrol (K; n=8): Bu gruptaki hayvanlar hiç bir uygulamaya tabi tutulmaksızın, kafeslerinde standart koşullarda barındırılmış ve standart sıçan yemi ile beslenmiştir.

2) Deksametazon (D; n=8): Bu gruptaki hayvanlar deney protokolünün başlangıcından itibaren K grubu ile aynı koşullarda barındırılmıştır. D grubundaki hayvanlara protokolün 6-10. günleri arasında subkutan olarak günde 1 defa 1 mg/kg dozda deksametazon enjeksiyonu yapılmıştır.

3) Normal Egzersiz (NE; n=8): Bu gruptaki hayvanlara, 10 gün standart egzersiz protokolü 25°C'lik oda sıcaklığında uygulanmıştır.

4) Normal Egzersiz ve Deksametazon (NED; n=8): Bu gruba NE grubundaki hayvanlara uygulanacak olan egzersiz protokolüne ek olarak, deney protokolünün 6-10. günleri arasında 5 gün süreyle 1 mg/kg/gün dozda subkutan deksametazon enjeksiyonu yapılmıştır (Tablo 3.1).

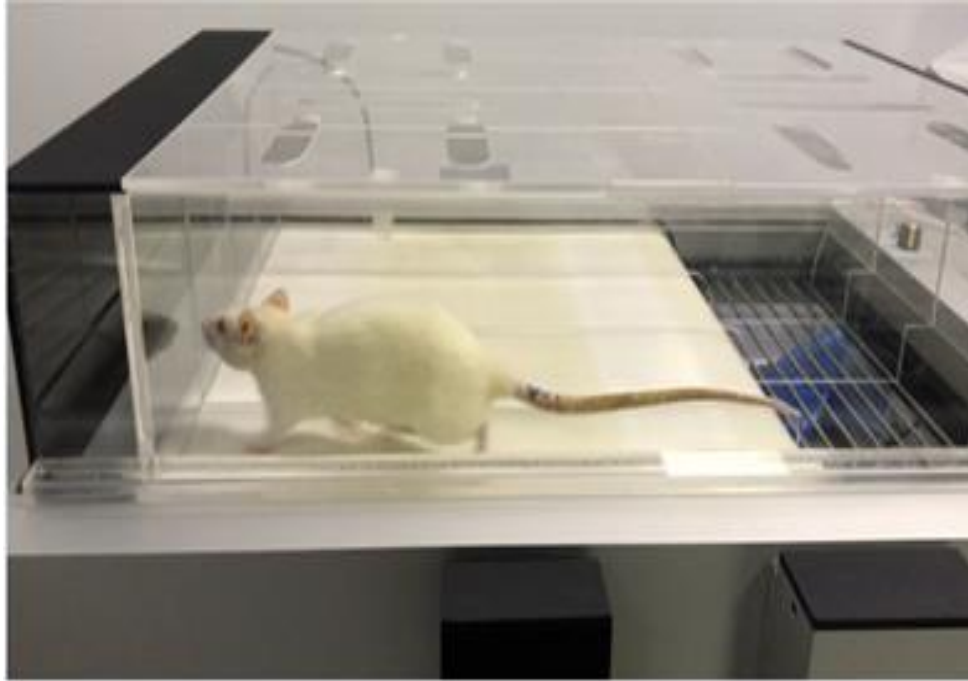
5) Soğuk Egzersiz (SE; n=8): Egzersiz protokolünün 4-8°C'deki odada gerçekleştiği gruptur. Bu gruptaki hayvanlar normal barınma koşulları olan 22-23°C'de yaşamlarını sürdürmüş, yalnızca egzersiz sırasında soğuk odaya alınmıştır.

6) Soğuk Egzersiz ve Dekametazon (SED; n=8): SE grubuna uygulanan egzersiz protokolüne ek olarak bu gruptaki hayvanlara 6-10. günler arasında 5 gün süreyle 1mg/kg/gün dozda subkutan deksametazon enjeksiyonu yapılmıştır (Tablo 3.1).

### 3.3. Egzersiz Protokolü

Vücut sıcaklığının 39,5-40 °C'ye ulaştığı koşullarda bir çok dokuda Hsp72 ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (92). Hamilton ve diğerlerinin (96) sıçanlarda egzersiz nedeniyle artan vücut sıcaklığının kalp kasında Hsp72 düzeylerine etkisini inceledikleri çalışmada, 25°C'de 5 gün ard arda  $VO_{2maks}$ 'ın %70'ine karşılık gelen şiddette yaptırılan koşu egzersizinin kalp kasında Hsp72 düzeylerini artırdığı, ancak 4°C ortam sıcaklığında aynı süre ve şiddette egzersiz yapan hayvanlarda vücut sıcaklığında Hsp72 indüksiyonuna neden olacak ölçüde artış olmadığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Ogura (37) ve Akın (38) sıçanlara 9 gün süresince 25°C ve 4°C oda sıcaklığında aynı süre ve şiddette koşu egzersizi yaptırmış ve 25 °C'de egzersiz yapan hayvanlarda kalp, iskelet kası, adrenal bezi ve plazmada Hsp72 düzeylerinin 4°C'de egzersiz yapan hayvanlara göre yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle, çalışmada uygulanan egzersiz protokolünün vücut sıcaklığındaki artışa bağlı olarak iskelet kasında Hsp72 indüksiyonu artırmak için yeterli olduğu düşünülmüştür.

Sıçanlara özel olarak üretilmiş koşu bandında (Şekil 3.1.) uygulanan egzersiz protokolü Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Egzersizler ilk gün, % 0 eğimde, 20-25 m/dk ve 10 dakika süre ile başlamış ve 5. güne kadar yoğunluğu dereceli olarak artırılmıştır. Egzersiz protokolünün 5. gününden son gün olan 10. güne kadar % 0 eğim, 30 m/dk ve 60 dk olacak şekilde uygulanmıştır. Hayvanlara egzersizin başlangıcında koşmaya motive etmek için birkaç kez elektrik uyarısı (30-40 V) verilmiştir. Koşu bandının hayvanlar üzerinde yaratabileceği stresin ortadan kaldırılması amacıyla kontrol grubundaki hayvanlar diğer grupların egzersiz yaptıkları sürede hareketsiz bir koşu bandına yerleştirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Sıçanlar için üretilmiş motorize koşu bandı.

**Tablo 3.1.** Deney dizaynı.

	Günler									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Koşu Hızı (m/dk)	20-25	20-25	20-25	20-25	30	30	30	30	30	30
Koşu Süresi (dk)	10	20	30	40	60	60	60	60	60	60
Deksametazon (mg/kg)						1	1	1	1	1

### 3.4. Deksametazon Enjeksiyonu

Günlük 1 mg/kg dozdaki deksametazonun sıçanda 3. günden itibaren iskelet kası atrofisine neden olduğu bilinmektedir (Minet-Quinard vd., 2000). Bu nedenle bu çalışmada subkutan deksametazon enjeksiyonu D, SED ve NED gruplarına 5 gün süreyle günde 1 defa 1 mg/kg dozda yapılmıştır (Tablo 3.1). Deksametazon enjeksiyonunun 6. günden başlayarak yapılmış olmasının gerekçesi ise, özellikle 5 ve 6. günlerde yaptırılan egzersizin süresi ve şiddeti göz önüne alındığında, bu süre ve şiddetteki egzersizin sıçanların iskelet kasında Hsp72 düzeylerini artıracak olmasıdır. Deksametazon verilmeyen gruplara aynı miktarda subkutan serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır.

### 3.5. Vücut Sıcaklığının Ölçümü

Her egzersiz seansının öncesinde ve sonrasında sıçan ve fare gibi kemirgenlere özel tasarlanmış termistör prob aracılığı ile hayvanların vücut sıcaklıkları ölçülmüştür. Oda sıcaklığında egzersiz yapan hayvanların vücut sıcaklıklarının 40-41°C'ye ulaştığı, 4-12°C'deki ortam sıcaklığında egzersiz yapan grupta ise 38-39°C aralığında kaldığı belirtilmiştir (Fonseca vd., 2014; Akın vd., 2017).

### 3.6. Ötenazi Ve Doku İzolasyonu

Egzersiz grubundaki hayvanlar deney protokolünü tamamladıkları 10. günü takip eden 24. Saatte (11. Gün) 90mg/kg ketamin-ksilazin enjekte edilerek derin anestezi altındayken ötenazi edilmiştir. Protein analizleri için doku alımları arasında günün saati açısından ciddi bir fark ortaya çıkmaması için deney protokolüne her gün 8 hayvan dahil edilmiştir. Böylece 1. gün deney protokolüne dahil edilen 8 hayvan 11. günde ötenazi edilirken, 8. gün dahil edilen 8 hayvan 19. günde ötenazi edilerek deney protokolü tamamlanmıştır. Her iki bacadan plantaris kası izole edildikten sonra hızlı bir şekilde hassas tartı ile ağırlıkları belirlenmiştir. Sağ bacadan izole edilen plantaris kasları polipropilen tüpler içerisinde likit nitrojene daldırılarak dondurulmuş ve analiz edilinceye kadar -80°C dondurucuda saklanmıştır. Plantaris kasının tercih edilmesinin nedeni, glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisinin daha çok hızlı kas liflerinde (tip IIx ve IIb) görülmesi ve plantaris kasının da hızlı kas liflerinden zengin olmasındandır.

### 3.7. Analiz Yöntemleri

#### 3.7.1. Protein Analizi

Plantaris kasından 50 mg alınarak 100 mM HEPES (pH 7.9), 10mM KCl, 0,1mM EDTA (pH 8.0), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT 0,1 mM PMSF, 0.05% NP40, fosfataz ve proteaz inhibitörleri içeren homojenizasyon tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası sitozolik protein analizi için homojenatlar 7500 xg'de 15 dakika santrifüj edilip süpernatantlar polietilen tüplere aktarılmıştır.

### 3.7.2. Western Blot Analizi

Plantaris kasında, Hsp72, p-FoxO3a, p-Akt1 ve Akt1 protein miktarları Western Blot yöntemi ile belirlenmiştir. Örneklerin protein içerikleri bikinkoninik asit yöntemi (BCA) ile belirlendikten sonra 20-40 µg protein, moleküler ağırlıklarına göre değişen yüzdelere sahip (%12, %10, %8) tek boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)'ne yüklenmiştir. Proteinler elektroforez sistemi (Bio-Rad, mini protean) ile yaklaşık 2 saat süreyle moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Ardından proteinler 0,45µm kalınlığında nitroselüloz membranlara (BioRad), yarı kuru transfer sistemi (Trans-Blot Turbo, BioRad) ile 20 V elektrik akımında 30 dakika süresince transfer edilmiştir. Transfer işlemi tamamlanan membranlar, Tween20-Tris Salin (TBST) ile yıkandıktan sonra içerisinde %3-5 BSA ya da kuru süt içeren TBST ile 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklamadan sonra tekrar TBST ile yıkanan membranlar Tablo 3.1'de gösterilen birincil antikorlar ile üretici firmanın kullanım talimatlarına uygun şekilde +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.

**Tablo 3.2.** Western Blot için birincil antikorlar.

	Molekül Ağırlığı	Firma
Hsp72	72	Stressgen
p-Akt (Ser473)	60	Cell Signaling
Akt1	60	Cell Signaling
p-FoxO3a (Ser253)	97	Cell Signaling

Birincil antikorlar ile inkübe edildikten sonra TBST ile yıkanan membranlar, alkalin fosfotaz (AP) veya "Horse Radish" peroksidaz (HRP) -konjuge ikincil antikorlar ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir. Membranlar tekrar TBST ile yıkandıktan sonra protein bantları kemilüminesans substrat (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, 170-5061) ya da BCIP/NBT (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad, 170-6432) kullanılarak görüntülenmiştir. Protein bantlarının yarı nicel tayinleri ImageJ, NIH görüntü analizi ile belirlenmiştir.



### 3.7.3. Verilerin Analizi

Değişkenler, ortalama ve standart sapma biçiminde gösterilmiştir. İki den fazla sayıda grubun karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi ve ikili karşılaştırmalar için ise Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Vücut ağırlıklarındaki ve vücut sıcaklığındaki değişimler, ikiden fazla zaman dilimi için Çift Yönlü Varyans Analizi Testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerin tümünde anlamlı düzey olarak  $p < 0,05$  kabul edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

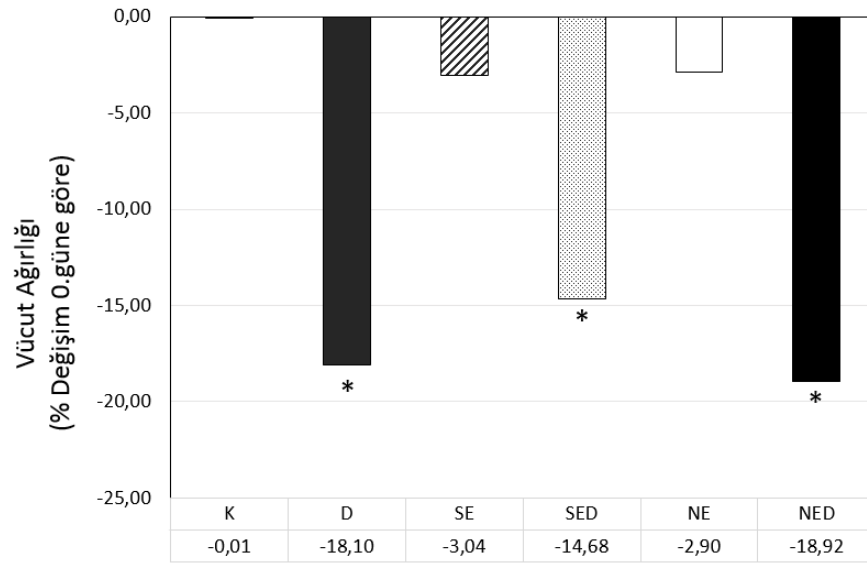
Bu çalışma, glukokortikoid kaynaklı oluşan iskelet kası atrofisinin önlenmesinde egzersizle artan vücut sıcaklığına bağlı indüklenen Hsp72'nin, protein sentez ve degradasyon yollarındaki moleküller üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Ortalama 235-245 g 48 adet dişi Sprague Dawley cinsi sıçan; K, D, SE, SED, NE ve NED olmak üzere 6 eşit gruba dağıtılmıştır (n=8). SE, SED, NE, NED sıçanlarına hızı ve süresi giderek artan ve 5. günde 30 m/dk hız ve 60 dk süreye ulaşan koşu egzersizi yaptırılmıştır. SE ve SED gruplarına 4-8°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yaptırılırken NE ve NED gruplarında 25°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yaptırılmıştır. Bununla birlikte D grubundaki sıçanlara deneye dahil olduklarında, SED ve NED grubundaki sıçanlara ise egzersiz protokolünün 6. gününde başlayarak 5 gün süre ile günde 1 mg/kg dozda deksametazon enjeksiyonu yapılmıştır. K, D, SE, SED, NE ve NED gruplarından elde edilen plantaris kasında Hsp72, pAkt, Akt1, pFoxO3 moleküllerinin protein düzeyleri Western Blot yöntemi ile incelenmiştir.

##### 4.1. Vücut ve Kas Ağırlığı Bulguları

Tablo 4.1 'de deney hayvanlarının deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıklarının standart sapmaları ile birlikte ortalama değerleri verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Deney hayvanları vücut ağırlıkları (VA).

Gruplar	Başlangıç VA (g)	Ötenazi VA (g)
	$\bar{x} \pm SS$	$\bar{x} \pm SS$
K	241,6 $\pm$ 21,3	241,5 $\pm$ 21,1
D	246,6 $\pm$ 24,9	209,1 $\pm$ 23,4
SE	244,9 $\pm$ 20,8	237,7 $\pm$ 20,4
SED	245,6 $\pm$ 26,0	214,7 $\pm$ 24,2
NE	237,2 $\pm$ 12,4	230,5 $\pm$ 10,5
NED	237,1 $\pm$ 8,6	199,5 $\pm$ 8,3



**Şekil 4.1.** Grupların 0.gün ağırlıklarına göre % vücut ağırlığı değişimleri. \* $p < 0,05$  K grubuna göre anlamlı olarak düşük.

Şekil 4.1.'de deksametazon enjeksiyonu yapılan D, SED ve NED grubu hayvanların % olarak vücut ağırlıklarının K grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir ( $p < 0,05$ ). Sadece egzersiz yapan SE ve NE gruplarının % vücut ağırlıkları K grubuna göre anlamlı olarak değişmemiştir ( $p > 0,05$ )

Tablo 4.2'de tüm hayvanların plantaris kas ağırlıklarının başlangıç vücut ağırlıklarına oranı, tablo 4.4'te hayvanların egzersiz öncesi ve sonrası vücut sıcaklıklarının karşılaştırılmaları verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Plantaris kas ağırlıklarının başlangıç vücut ağırlıklarına (BVA) oranları.

Gruplar	Plantaris (mg)	Plantaris/BVA(mg/gr)
	$\bar{x} \pm SS$	$\bar{x} \pm SS$
K	227,7 $\pm$ 15,2	0,946 $\pm$ 0,054
D	190,0 $\pm$ 24,0	0,775 $\pm$ 0,044*
SE	231,0 $\pm$ 22,4	0,944 $\pm$ 0,058
SED	213,2 $\pm$ 27,8	0,855 $\pm$ 0,038*
NE	223,1 $\pm$ 14,9	0,940 $\pm$ 0,025
NED	206,4 $\pm$ 17,4	0,875 $\pm$ 0,050

\* $p < 0,05$  K'dan anlamlı olarak düşük K; Kontrol, D; Dekametazon, SE; Soğuk Egzersiz, SED; Soğuk Egzersiz ve Dekametazon, NE; Normal Egzersiz, NED; Normal Egzersiz ve Dekametazon.

Deksametazon enjekte edilen hayvanların (D) plantaris/BVA oranlarında anlamlı bir düşüş görülmektedir ( $p<0,05$ ), diğer taraftan deksametazon ile birlikte egzersiz soğuk ortamda egzersiz yapan sıçanların (SED) plantaris/BVA oranları D grubuna göre anlamlı olarak yüksek ( $p<0,05$ ) ancak K grubuna göre düşüktür ( $p<0,05$ ). Deksametazon enjeksiyonu ile birlikte normal ortam sıcaklığında egzersiz yapan NED grubu sıçanların plantaris/BVA oranı D grubundaki düşüştan anlamlı düzeyde korunmuştur ( $p<0,05$ ) ve dahası K grubuna göre farklı değildir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.3.** Plantaris kas ağırlıklarının başlangıç vücut ağırlıklarına (BVA) oranlarının p değeri tablosu.

Gruplar	Plantaris/BVA(mg/gr)					
	K	D	SE	SED	NE	NED
K		$p<0,001$	$p=1,000$	$p=0,014$	$p=1,000$	$p=0,095$
D			$p<0,001$	$p=0,049$	$p<0,001$	$p=0,007$
SE				$p=0,016$	$p=1,000$	$p=0,105$
SED					$p=0,023$	$p=0,973$
NE						$p=0,144$
NED						

\* $p<0,05$  K'dan anlamlı olarak düşük K; Kontrol, D; Deksametazon, SE; Soğuk Egzersiz, SED; Soğuk Egzersiz ve Deksametazon, NE; Normal Egzersiz, NED; Normal Egzersiz ve Deksametazon.

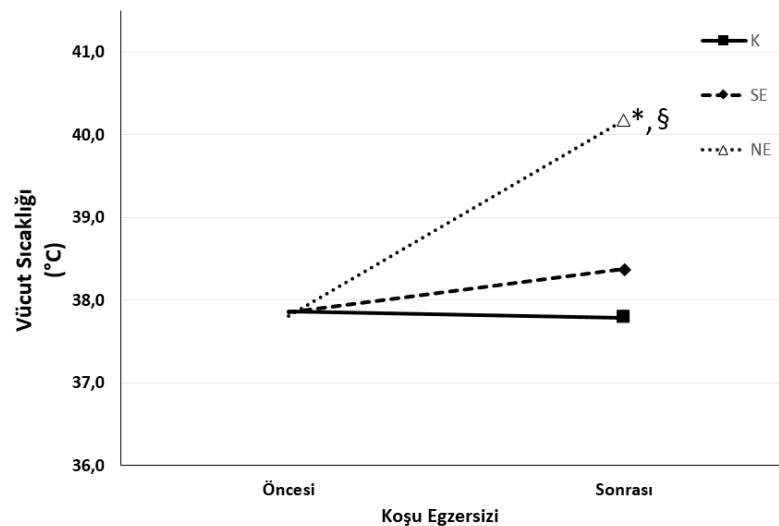
Tablo 4.3'te K ile D grubu arasında anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). K ile SED arasında anlamlı bir azalma varken, ( $p<0,05$ ) K ile NED arasında anlamlı bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). SED ve NED gruplarının ikisi de D grubuna göre anlamlı düzeyde fazladır ( $p<0,05$ )

**Tablo 4.4.** Deney hayvanlarının egzersiz öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları (°C).

Gruplar	Öncesi (°C)	Sonrası(°C)
	$\bar{x} \pm SS$	$\bar{x} \pm SS$
K	37,9± 0,25	37,8±0,24
D	37,9 ±0,15	37,9±0,20
SE	37,9 ± 0,13	38,4±0,11
SED	37,9 ±0,23	38,3±0,11
NE	37,8 ±0,20	40,2±0,36*§
NED	37,9 ±0,33	40,1±0,33*§

\*p<0,05 Grup içerisinde farklı (Öncesi-Sonrası); §p<0,05 K, SE ve SED anlamlı olarak yüksek. K; Kontrol, D; Dekametazon, SE; Soğuk Egzersiz, SED; Soğuk Egzersiz ve Dekametazon, NE; Normal Egzersiz, NED; Normal Egzersiz ve Dekametazon.

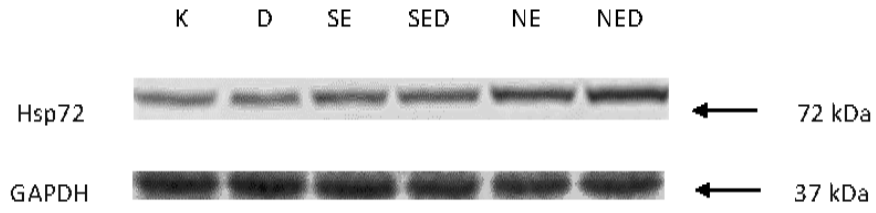
Tablo 4.4'e göre normal oda sıcaklığında egzersiz yaptırılan NE ve NED gruplarının egzersiz sonrası vücut sıcaklıklarının egzersiz öncesi vücut sıcaklıklarına göre arttığı (p<0,05), soğuk ortamda egzersiz yapan SE ve SED gruplarının egzersiz sonrası vücut sıcaklıklarına göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu (p<0,05) ancak SE ve SED gruplarının egzersiz öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları arasında anlamlı bir artış olmadığı görülmüştür (p>0,05). Diğer taraftan D grubu hayvanlarda deksametazon enjeksiyonunun vücut sıcaklığında bir fark yaratmadığı görülmüştür (p>0,05).



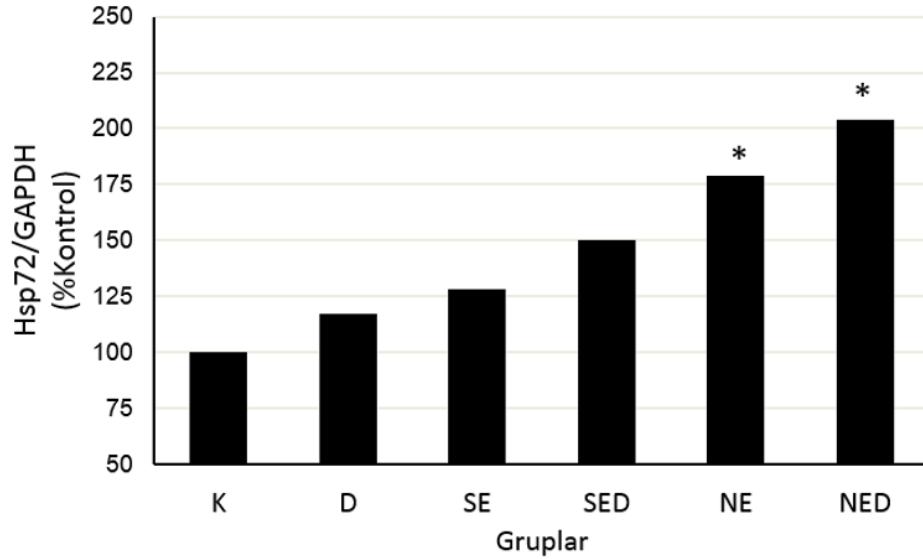
**Şekil 4.2.** Farklı ortam sıcaklıklarında egzersiz yapan SE ve NE gruplarının egzersiz öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları (°C). \* Grup içerisinde farklı p<0,05; § K ve SE'den farklı. K; Kontrol, SE; Soğuk Egzersiz, NE; Normal Egzersiz.

Şekil 4.2.'de 4-8°C egzersiz yapan SE ve 25°C egzersiz yapan NE grubunun egzersiz öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları görülmektedir. NE grubunun egzersiz sonrası vücut sıcaklığı öncesine göre anlamlı olarak artarken ( $p<0,05$ ) SE grubunda bu artış görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Diğer taraftan K grubunun vücut sıcaklıklarında bir değişiklik gözlemlenmemiştir ( $p>0,05$ ).

#### 4.2. Western Blot Yöntemi ile Protein Düzeyine İlişkin Bulgular

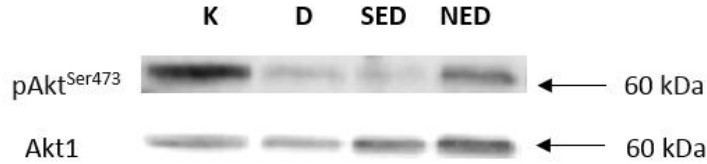


**Şekil 4.3.** Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam sıcaklıklarında egzersizin iskelet kası Hsp72 protein düzeylerine etkisi (Western Blot).

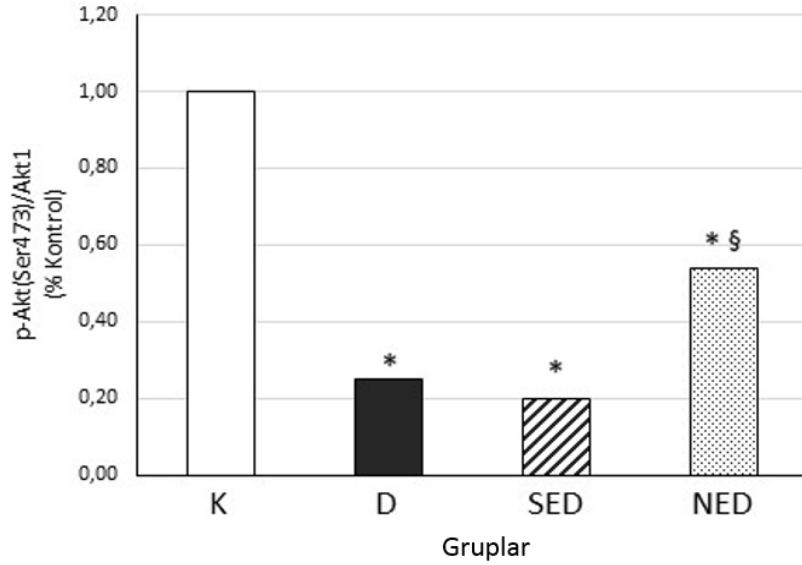


**Şekil 4.4.** Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam sıcaklıklarında egzersizin Hsp72 protein düzeyleri üzerine etkisi, K; Kontrol, D; Dekametazon, SE; Soğuk Egzersiz, SED; Soğuk Egzersiz ve Dekametazon, NE; Normal Egzersiz, NED; Normal Egzersiz ve Dekametazon, \* $p<0,05$  K'dan farklı.

Şekil 4.4.'de NE ve NED gruplarının K grubundan anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). K ile SE ve SED arasında anlamlı düzeyde artış görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Buna göre soğuk ortamda egzersizin plantaris kası Hsp72 düzeylerini anlamlı ölçüde arttırmadığı görülmektedir.

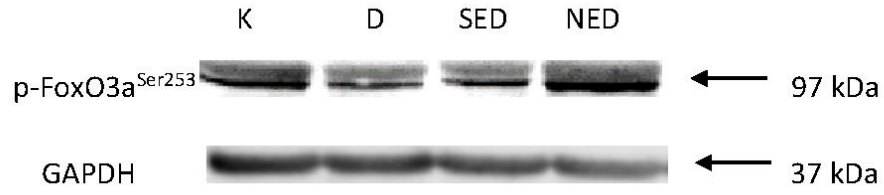


**Şekil 4.5.** Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin iskelet kası p-Akt ve Akt1 protein düzeylerine etkileri (Western Blot görüntüleri)

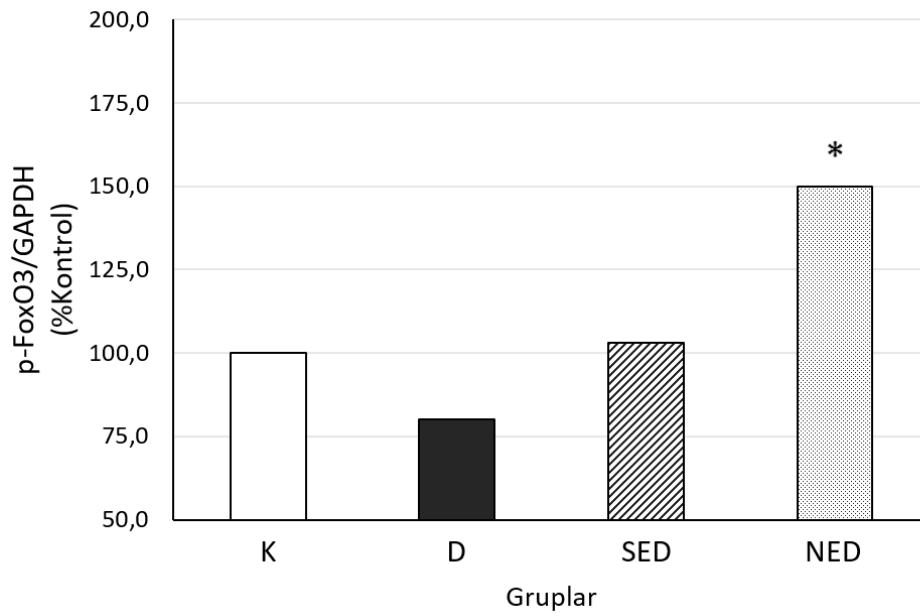


**Şekil 4.6.** Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin p-Akt/Akt1 düzeyleri üzerine etkisi. \*  $p<0,05$  K'dan düşük, § $p<0,05$  D ve SED'den yüksek, K; Kontrol, D; Dekametazon, SED; Soğuk Egzersiz ve Dekametazon, NED; Normal Egzersiz ve Dekametazon.

Şekil 4.6.'e göre K grubu p-Akt düzeyleri bütün deksametazon enjeksiyonu yapılan gruplardan anlamlı olarak yüksek ( $p<0,05$ ). Diğer taraftan NED grubu p-Akt düzeyleri D ve SED grubundan anlamlı düzeyde yüksek ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.7.** Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin iskelet kası p-FoxO3a/GAPDH protein düzeylerine etkisi (Western Blot).



**Şekil 4.8.** Dekametazon enjeksiyonu ve farklı ortam koşullarında yaptırılan egzersizin p-FoxO3a/GAPDH düzeyleri üzerine etkisi. \* $p < 0,05$  D'den anlamlı olarak yüksek. K; Kontrol, D; Dekametazon, SED; Soğuk Egzersiz ve Dekametazon, NED; Normal Egzersiz ve Dekametazon.

Şekil 4.8'te NED grubunun p-FoxO3 düzeylerinin D grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmektedir( $p < 0,05$ ).



## 5. TARTIŞMA

İmmobilizasyon, denervasyon, inaktivite, kanser kaşeksi, sepsis, kronik böbrek ve kalp yetmezliği gibi birçok fizyolojik ve patolojik koşulun yanı sıra; tedavi amaçlı kullanılan glukokortikoidler de kas kütlelerinde ve kuvvetinde azalmaya birlikte iskelet kaslarında atrofiye neden olur(97). Azalan kas kütlelerinin başta insülin direnci, tip 2 diyabet ve metabolik sendrom gibi kronik hastalıklara yol açtığı, yaşam kalitesini düşürerek morbitide ve mortalitede artışa neden olduğu bilinmektedir (1).

Glukokortikoidlerin, her yıl 10 milyonun üzerinde reçete edilmesi ve ilaç kaynaklı iskelet kası atrofisi nedenleri arasında ilk sırada yer alıyor olması nedeniyle atrofi koşulları arasında özel bir yeri vardır. Bütün bu nedenlerle, glukokortikoid kaynaklı kas atrofisinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve kas atrofisinin önlenmesine yönelik yeni tedavi yöntemleri ve stratejiler geliştirilmesi son derece önemlidir. Bu çalışma egzersizin glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisini önlemedeki rolünün Hsp72 üzerinden gerçekleştirip gerçekleştirmediğinin ortaya konması amacı ile yapılmıştır.

Çalışmada plantaris kası tercih edilmesinin nedeni, deksametazonun iskelet kaslarında neden olduğu atrofiyi daha çok hızlı kasılan glikolitik tip IIx ve tip IIb liflerinden zengin kaslarda meydana getirmesidir (98, 99). Sıçan plantaris kas lifi kompozisyonunun neredeyse %90'ının hızlı kasılan liflerden meydana geldiği bilinmektedir (100). Bu nedenle plantaris kasının, çalışmanın hipotezini test edebilmek için uygun bir kas olduğu düşünülmüştür.

Çalışmanın hipotezini ortaya atarken literatür bulgularından yola çıktığımız iki ön koşul bulunmaktadır. Bunlardan birincisi beş günlük 1 mg/kg dozda subkutan deksametazon enjeksiyonunun plantaris kasında atrofiye yol açmasıdır. Nitekim plantaris kas ağırlığı/BVA oranları gruplar arasında karşılaştırıldığında deksametazon uygulamasının anlamlı olarak iskelet kası atrofisine yol açtığı görülmüştür ( $p<0,05$ ). Bu durum bize hipotezimizi oluştururken kabul ettiğimiz bu ön koşulun gerçekleştiğini göstermiştir.

Çalışmamızda hipotezlerimizi oluştururken literatür bulgularından yola çıkarak kabul ettiğimiz ikinci ön koşul ise, 4-8°C'lik ortam sıcaklığında yapılan

egzersizin plantaris kasında Hsp72 indüksiyonuna yol açmazken, 25°C'lik ortam sıcaklığındaki egzersiz grubunda iskelet kası Hsp72 düzeylerinin artmasıdır. Gerçekten de literatür bulguları 4-12°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yaptırılan sıçanların kalp kası, iskelet kası ve adrenal bezleri gibi çeşitli dokularında vücut sıcaklığındaki artışın engellenmesine bağlı olarak Hsp72 indüksiyonunun gerçekleşmediğini göstermektedir (37, 38, 93). Bizim çalışmamızda da soğuk ortamda egzersiz yaptırılan sıçanların plantaris kası Hsp72 düzeylerinde anlamlı bir artış görülmezken ( $p>0.05$ ), 25°C'lik ortam sıcaklığındaki egzersiz gruplarının iskelet kası Hsp72 düzeyleri anlamlı düzeyde artmıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.1). Bu bulgular bize hipotezimizi ortaya atmamızı sağlayan ikinci ön koşulun da sağlandığını göstermektedir.

Çalışmanın bulguları egzersizin glukokortikoid kaynaklı iskelet kas atrofisinin korunmasındaki rolünün kısmen de olsa Hsp72 üzerinden gerçekleşebileceğini göstermektedir. Vücut sıcaklığı artışının gerçekleştiği ortam sıcaklığında egzersiz yapan NED grubu hayvanlarının, soğuk ortamda egzersiz yapan SED grubuna göre glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisinden daha fazla korunduğunu göstermektedir (sırasıyla,  $p=0,007$  ve  $p=0,049$ ). Bu durum birinci hipotezimizin desteklendiğini göstermektedir. Buna ek olarak, Hsp72'nin indüklendiği NED grubunda p-Akt düzeylerinin deksametazon grubu ve SED grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olması ( $p<0,05$ ) ve sitozolik p-FoxO3 düzeylerinin yalnızca NED grubunda D grubuna göre anlamlı olarak yüksek olması ( $p<0,05$ ) ikinci hipotezimizin de desteklendiğini göstermektedir. Aşağıda elde edilen bulguların ayrıntılı tartışması verilmiştir.

### **5.1. Plantaris Kas Ağırlığındaki Değişiklikler**

İskelet kas atrofisi; kullanmama, immobilizasyon, denervasyon ve uzun süreli yatak istirahati gibi fizyolojik nedenlerin yanı sıra; kanser kaşeksi, diyabet, kalp ve böbrek yetmezliği, sepsis gibi çeşitli patolojik koşullar kas kütlesinde ve kuvvetinde kayıp ile karakterizedir. Özellikle hayvanlarda, iskelet kas atrofisinin belirlenmesi için en temel yöntemlerden biri kas ağırlığının vücut ağırlığına bölünmesidir. Çalışmada iskelet kas atrofisi, hayvanların plantaris kas ağırlıklarının, başlangıç vücut ağırlıklarına

bölünmesi ile belirlenmiştir. Deksametazon enjeksiyonunun sıçanlarda 5 gün gibi kısa bir sürede ciddi oranda kilo kaybına neden olduğu, ancak bu kaybın yalnızca bir bölümü iskelet kaslarından oluştuğu düşünülmektedir. Bu nedenle, başlangıç vücut ağırlıklarının hesaba katılması ile bütün sıçanların başlangıç kas ağırlıkları eşit kabul edileceği gibi deksametazon alan grupların kaybettikleri vücut ağırlıklarının ne kadarının kas kütesinden olduğu daha doğru bir şekilde analiz edilmiştir. Benzer şekilde immobilizasyon kaynaklı oluşan iskelet kas atrofisinin belirlenmesinde de kas ağırlığının başlangıç vücut ağırlığına oranlanması kullanılmaktadır (101).

Birçok hayvan çalışmasında farklı tür glukokortikoidlerin, çeşitli sürelerde ve değişik dozlarda kullanımının özellikle tip II liflerinden zengin EDL, tibialis anterior ve gastrokinemius gibi kasların ağırlıklarının azalmasına ve lif çaplarının küçülmesine yol açarak atrofiye neden olduğu ortaya konmuştur (35, 99, 102). Örneğin Minet ve ark. (14) deksametazon enjeksiyonunun sıçanlarda hangi doz ve sürede atrofi oluşturduğunu araştırdıkları çalışmada, 1,5 mg/kg/gün dozda verilen deksametazonun yalnızca 3. günde EDL ve gastrokinemius kas ağırlıklarında anlamlı düşüşe neden olurken, tip I liflerden zengin soleus kasında bu düşüşün yaşanmadığını göstermişlerdir. Aynı çalışmanın devamında ise 5 gün süre 0,75 mg/kg/gün, 1,5 mg/kg/gün ve 2,5 mg/kg/gün olmak üzere 3 farklı dozda deksametazon enjeksiyonunun gastrokinemius kas ağırlığında yaklaşık %25'lik bir azalmaya yol açtığını ve dozlar arasında iskelet kas atrofisi açısından anlamlı bir fark bulunmadığını ortaya koymuşlardır (14). Benzer şekilde sıçanlarda farklı sentetik glukokortikoidlerin değişik dozlarda verildiği ve iskelet kası üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise deflazakort, deksametazon ve metilprednizolonun 1,25 mg/kg/gün ve 2,5 mg/kg/gün dozlarının 10 gün boyunca subkutan enjeksiyonu tibialis anterior ve gastrokinemius kaslarının ağırlıklarında anlamlı bir düşüşe yol açtığı gösterilmiştir. Çalışma bulgularında verilen histokimya analizlerine göre tibialis anterior kasında glukokortikoid kaynaklı oluşan atrofisinin neredeyse tamamının tip IIb liflerinde meydana geldiği ve çalışmamızda da kullanılan deksametazonun değişik dozları arasında kas atrofisi açısından bir fark olmadığı belirtilmiştir (103). Çalışmamızda literatürdeki sonuçlara paralellik gösteren bir şekilde, kullandığımız 1 mg/kg/gün 5

gün süre deksametazon dozu da D grubu hayvanların plantaris kas ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranlarında, K grubuna göre %15'in üzerinde düşüşe yol açmıştır ( $p<0,05$ ).

Çalışmamızda deksametazon enjeksiyonun yanında egzersiz protokolü uygulanan gruplar olan SED ve NED'in plantaris kas ağırlıklarının başlangıç vücut ağırlıklarına oranlarına bakıldığında ise SED'de K grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ( $p<0,05$ ) görülürken, NED grubunda bu azalış engellenmiştir ( $p>0,05$ ). Gerçekten de, çok sayıda çalışma egzersizin glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisi üzerinde koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir (27, 28, 86, 104). Nitekim, koşu egzersizi ile antrene edilen sıçanlara 10 gün süre ile glukokortikoid verildiğinde plantaris ve gastrokinemus kaslarının atrofiden kontrol grubuna göre neredeyse %50'e varan bir oranda korunduğunun gösterilmesi, egzersizin glukokortikoid kaynaklı iskelet kas atrofisinden koruyabileceğine dair bir kanıt niteliğindedir (86). Benzer şekilde 11 gün boyunca kortizol asetat enjeksiyonu ile birlikte 29 m/dk %10 eğimde 90 dakika egzersiz yapan sıçanların plantaris kas ağırlıklarının ve kas lif çaplarının korunduğu gösterilmiştir (28). Her ne kadar bu çalışmalarda egzersizin, glukokortikoid kaynaklı iskelet kas atrofisinden koruduğu gösterilmişse de, egzersiz yapan hayvanların vücut sıcaklıkları veya egzersiz yaptıkları ortam sıcaklıkları verilmemiştir. Bu şiddet ve sürede yapılan egzersizin (28) vücut sıcaklığında artışa yol açtığı bilinmektedir (37, 38).

Egzersizin glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisi üzerindeki koruyucu rolünün vücut sıcaklığındaki artışa bağlı olup olmadığı, bir atrofi çalışmasında bildiğimiz kadarı ile ilk defa kullanılan vücut sıcaklığı artışının engellendiği soğuk ortamda egzersiz yapan SED grubu hayvanları ile test edilmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre deksametazon enjeksiyonu ile birlikte 4-8°C ve 25°C'lik iki farklı ortam sıcaklığında egzersiz yapan NED ve SED grubu hayvanların plantaris/BVA oranları D grubuna göre korunmuştur ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte, NED grubu hayvanların plantaris/BVA oranı K grubu ile karşılaştırıldığında farklı olmadığı ( $p>0,05$ ) ancak SED grubu hayvanların plantaris/BVA oranının K grubuna göre anlamlı olarak düştüğü görülmektedir ( $p<0,05$ ). Bütün bunlar bize

egzersizin glukokortikoid kaynaklı kas atrofisini geri çevirmesinde artan vücut sıcaklığının rol oynadığını göstermektedir.

## 5.2. Vücut Sıcaklığı ve Hsp72 Bulguları

Hsp72 düzeylerinin vücut sıcaklığında artış başta olmak üzere, sitozolik kalsiyum düzeylerinin artması ve hipoksi gibi birçok stres karşısında arttığı bilinmektedir (30, 31). Artan Hsp72 düzeylerinin iskelet kaslarını denervasyon, kuyruktan asma, immobilizasyon ve glukokortikoid kullanımı gibi çeşitli atrofi koşullarından koruduğu rapor edilmiştir (34, 35, 105)

Egzersiz Hsp72 indüksiyonuna neden olan neredeyse bütün stres koşullarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Nitekim egzersizin, şiddetine ve süresine bağlı olarak iskelet kaslarında Hsp72 düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (33). Özellikle vücut sıcaklığındaki artışın Hsp72 indüksiyonu için kritik olması (92), vücut sıcaklığında belirli bir düzeyin üzerinde artışa yol açmayan egzersizlerin Hsp72 düzeylerini artırmayacağını düşündürmektedir. Nitekim vücut sıcaklığındaki artışın engellendiği 4°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yapan sıçanların kalp ve gastroknemius kaslarında Hsp72 indüksiyonunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (37). Aynı çalışmada soğuk ortam egzersiz yaptırılan sıçanların vücut sıcaklıkları en fazla 38,3 °C'ye çıkarken, 25°C ortam sıcaklığında aynı egzersiz süresi ve şiddetinde koşan hayvanların vücut sıcaklıklarının Hsp72 indüksiyonu için gereken 40°C'nin üzerine çıktığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da bu bulguyu destekler nitelikte 4-8°C'lik ortamda egzersiz yaptırılan SE ve SED gruplarındaki sıçanların vücut sıcaklıkları ortalama 38,4°C'ye ulaşmış ancak, beklendiği gibi plantaris kası Hsp72 düzeyleri artmamıştır ( $p>0,05$ ). Diğer taraftan 25°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yaptırılan NE ve NED gruplarındaki sıçanların vücut sıcaklıkları 40°C'nin üzerine çıkmıştır ve plantaris kası Hsp72 düzeyleri K grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır ( $p<0,05$ ).

SED grubunda plantaris kası Hsp72 düzeylerinin artmamasına karşın, kas ağırlıklarının D grubuna göre yüksek olması ( $p<0,05$ ), egzersizin glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisinden korumadaki rolünü tamamıyla Hsp72 üzerinden gerçekleştiriyor olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim SED ve NED grupları

arasında plantaris/BVA açısından anlamlı bir fark bulunmayıp ( $p>0,05$ ), gerek SED ve gerekse NED grubundaki hayvanlarda bu oran D grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ). Diğer yandan, bu farklılığın özellikle SED grubunda daha belirgin olması, ayrıca NED grubunun aksine SED grubunda plantaris/BVA oranının kontrol grubundan anlamlı olarak düşük olması ( $p<0,05$ ), SED grubunda da belirli ölçüde deksametazonun yol açtığı atrofinin önlendiğini göstermektedir.

Egzersiz, vücut sıcaklığına bağlı olarak Hsp72 düzeylerini artırmasının yanında iskelet kası atrofisinde rol oynadığı bilinen oksidatif stres (106) ve mitokondriyel disfonksiyon (107) gibi başka faktörler üzerinden de etkisini gösterdiği bilinmektedir. Her ne kadar bu çalışmada oksidatif stres ya da mitokondriyal disfonksiyona ilişkin bulgu olmasa da, SED grubunun kas ağırlığının D grubuna göre yüksek olmasının ( $p<0,05$ ) egzersizin kas atrofisi üzerindeki koruyucu etkisini başka mekanizmalar üzerinden de gerçekleştirdiğini gösterir niteliktedir.

### 5.3. Akt ve FoxO Bulguları

İskelet kası protein sentezi ve degradasyon yollarının merkezinde Akt bulunmaktadır. Akt bir yandan protein sentezinin temel düzenleyicisi olan IGF-1 sinyal yolağında bulunan mTOR'un fosforilasyonunu sağlarken, diğer yandan protein degradasyonunda temel rol oynayan FoxO transkripsiyon faktörlerini kontrol eder. Anti-anabolik ve katabolik etkilere sahip deksametazonun protein sentez ve degradasyon yolağında bulunan Akt'nin fosforilasyonunu azalttığı bir çok defa gösterilmiştir (70, 99, 108). Bu çalışmada D, SED ve NED gruplarındaki hayvanların plantaris kası p-Akt düzeylerinin azalması literatür bulgularını destekler niteliktedir ( $p<0,05$ ).

Diğer taraftan, beklenildiği gibi NED grubunun p-Akt düzeyleri D ve SED gruplarından yüksektir ( $p<0,05$ ). Nitekim vücut sıcaklığındaki artışın engellendiği 4°C'lik ortamda egzersiz yapan sıçanlarda p-Akt düzeylerinin artmadığı, vücut sıcaklığı artışının engellenmediği 25°C'lik ortamda egzersiz yapan sıçanların p-Akt düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (95).

Çalışmamızda deksametazon kaynaklı plantaris kas kütlesi kaybından en çok korunan grup olan NED grubunun aynı zamanda deksametazon enjekte edilen gruplar arasında en yüksek Hsp72 ve p-Akt düzeylerine sahip olması hipotezlerimizi destekler niteliktedir.

Sitozolda FoxO3 fosforilasyonunun azalması, FoxO3'ün çekirdeğe geçerek transkripsiyonel aktivitesini artırmasına, diğer bir deyişle UPS'yi aktive ettiği anlamına gelmektedir. Deksametazonun UPS'yi aktive ettiği çeşitli hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında ortaya konmuştur. Örneğin, sıçanlarda 10 gün süre ile çeşitli glukokortikoidlerin ve dozlarının iskelet kası atrofisinde rol oynayan moleküller üzerinde etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, çalışmamızda kullanılan 1 mg/kg/gün doza yakın olan 1,25 mg/kg deksametazon dozunun tibialis anterior kası p-FoxO3 düzeylerinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (99). Benzer şekilde C2C12 kas hücrelerinin bulunduğu ortama deksametazon verildiğinde p-FoxO3 düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (70). Elde ettiğimiz bulgular bize, NED grubunda Hsp72 ve p-Akt düzeyleriyle aynı doğrultuda sitozolik p-FoxO3 düzeylerinde yüksek olduğunu göstermektedir. Tablo 4.4'te plantaris kas ağırlığı/BVA tablosu deksametazon enjeksiyonu yapılan gruplar arasında plantaris kas ağırlığı en çok korunan hayvanların NED grubunda olduğunu göstermektedir.

Bütün bu bulgular bize, glukokortikoid kaynaklı kas atrofisinde egzersizin koruyucu rolününün bir kısmını artan vücut sıcaklığına bağlı olarak indüklenen Hsp72 üzerinden gerçekleştirdiğini göstermiştir. Diğer taraftan SED grubundaki hayvanların plantaris kas ağırlıklarının NED grubu hayvanları kadar olmasa da kısmen korunması ve iskelet kaslarında bir degradasyon belirteci olan p-FoxO3 düzeylerinin K grubu seviyesinde olması glukokortikoid kaynaklı atrofiden korunmada egzersizin etkisini Hsp72 dışında başka moleküller üzerinde de yapıyor olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu bulgular, yalnızca glukokortikoid nedeniyle oluşan kas atrofisi tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde değil, benzer moleküler mekanizmalara sahip olmaları nedeniyle atrofiye neden olan diğer koşulların moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında da yön verici olacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İskelet kasları hareket etmek, güç üretmek ve nefes almanın yanı sıra glisemik kontrol, metabolik gen regülasyonu ve metabolik homeostazın korunması gibi canlılığın devamı için son derece kritik süreçlerde önemli rol oynarlar. Sağlıklı bir kas kütesine sahip olmak metabolik sendrom, tip 2 diyabet gibi birçok kronik hastalıktan korumaktadır. Diğer taraftan, uzun süreli yatak istirahatleri, hareketsiz yaşam biçimi gibi fizyolojik koşullar da dahil olmak üzere endojen glukokortikoid düzeylerinin arttığı sepsis, tip 2 diyabet, kaşeksi gibi patolojik koşullar ve hastalıkların tedavilerinde kullanılan eksojen glukokortikoidler iskelet kaslarında kütle ve kuvvet kaybına neden olurlar. Böylece kişinin kas kaybı nedeniyle bir yandan yaşam kalitesi azalırken, diğer yandan kronik hastalıklara yakalanma ve dolayısıyla mortalite riski artmaktadır. Egzersizin iskelet kası atrofisine karşı korunmada en etkili yöntem olduğu bilinmektedir, ancak altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması çok sayıda atrofi koşuluna ilişkin tedaviler geliştirilmesine ışık tutacaktır.

Bu çalışmada egzersizle artan vücut sıcaklığına bağlı olarak indüklenen Hsp72'nin glukokortikoid kaynaklı iskelet kası atrofisini önlemedeki rolü protein sentez ve degradasyon yollarında kritik rol oynayan Akt ve FoxO3 molekülleri üzerinden incelenmiştir. Çalışmada deksametazon enjeksiyonu ile birlikte iki farklı ortam sıcaklığında egzersiz yaptırılan hayvanların iskelet kası ağırlıkları Hsp72, p-Akt ve p-FoxO3 düzeyleri incelenmiştir. Bu çerçevede Hsp72 indüksiyonunun gerçekleştiği 25°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yapan hayvanların deksametazon kaynaklı p-Akt ve p-FoxO3 düzeylerindeki düşüş engellenirken, 4-8°C'lik ortamda egzersiz yaptırılan hayvanların Hsp72 düzeyleri artmamıştır ve p-Akt düzeylerinin deksametazon enjeksiyonu kaynaklı düşüş de engellenememiştir. Her ne kadar deksametazon enjeksiyonu yapılan bütün grupların p-Akt düzeyleri K grubuna göre anlamlı olarak azalmış olsa da, 25°C'lik ortam sıcaklığında egzersiz yaptırılan NED grubunda D ve SED grubuna göre daha fazla korunmuştur (p-Akt düzeyleri açısından NED ve SED grupları karşılaştırıldığında).

Diğer taraftan beklendiği gibi p-FoxO3 bulguları p-Akt bulgularıyla paralellik göstermektedir; plantaris kası p-FoxO3 düzeyleri SED grubunda D grubundan



farksızken, NED grubunda D grubuna göre yüksektir.. Bu bize Hsp72'nin indüklendiği ortamda egzersiz yaptırılmasının p-Akt ve dolayısıyla p-FoxO3 düzeyleri üzerinde koruyucu bir etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçların daha iyi yorumlanabilmesi ve çalışmanın daha ileri taşınabilmesi için öneriler;

1. Çalışmada, deksametazon enjeksiyonu 5 gün süre ile yapılmıştır. Bu süre atrofi oluşturmak için kısa ancak sinyal moleküllerinin aktivasyonunu görebilmek için uzun bir süredir. Bu çalışmada her iki durumun da değerlendirilebilmesi için 5 gün süreli deksametazon uygulaması tercih edilmiştir. Atrofi koşullarının tamamen gelişmesi için 10 günlük bir deksametazon kullanımı, sinyal moleküllerin aktivasyonu için ise 2-3 günlük bir kullanım sonunda ötenazi yapılması, dolayısıyla daha kısa ve daha uzun süreli deksametazon uygulamasıyla iki ayrı soruya daha net cevap verilebilmesi mümkün olabilir.
2. Çalışmada hayvanlar son egzersiz veya deksametazon dozlarının üzerinden 20-24 saat geçtikten sonra ötenazi edilmişlerdir. Burada farklı ortam sıcaklıklarında yaptırılan egzersizin akut etkisinin protein fosforilasyonu gibi kısa sürede gerçekleşen ve sona eren posttranslasyonel modifikasyonlar gibi süreçler açısından değerlendirilebilmesi için, egzersizden hemen sonra ötenazi edilecek grupların eklenmesi verilerin daha net yorumlanmasını sağlayabilecektir.
3. Çalışmada özellikle koşu türü egzersizlere daha yatkın ve daha uysal olmaları nedeniyle dişi Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Literatürde farklı atrofi modellerinde dişi ve erkek sıçanların özellikle incelediğimiz p-Akt ve p-FoxO3 gibi sinyal molekülleri açısından farklı yanıtlar verdiği gösterilmiştir. Aynı çalışmanın erkek sıçanlar ile tasarlanması deksametazona ve egzersize verilen yanıtların cinsiyet açısından da yorumlanabilmesini sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Baskin KK, Winders BR, Olson EN. Muscle as a "mediator" of systemic metabolism. *Cell Metab.* 2015;21(2):237-48.
2. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 2013;17(2):162-84.
3. Dumitru A, Radu BM, Radu M, Cretoiu SM. Muscle Changes During Atrophy. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1088:73-92.
4. Metter EJ, Talbot LA, Schrager M, Conwit R. Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57(10):B359-65.
5. Powers SK, Lynch GS, Murphy KT, Reid MB, Zijdwind I. Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* 2016;48(11):2307-19.
6. Buttgerit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.* 2004;50(11):3408-17.
7. Frew AJ. Glucocorticoids. In: Weyand RRTFWSHSAFC, editor. *Clinical Immunology*. 5th Edition ed: Elsevier; 2019.
8. Braun TP, Zhu X, Szumowski M, Scott GD, Grossberg AJ, Levasseur PR, et al. Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Exp Med.* 2011;208(12):2449-63.
9. Braun TP, Grossberg AJ, Krasnow SM, Levasseur PR, Szumowski M, Zhu XX, et al. Cancer- and endotoxin-induced cachexia require intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle. *FASEB J.* 2013;27(9):3572-82.
10. Hu Z, Wang H, Lee IH, Du J, Mitch WE. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(10):3059-69.
11. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol.* 2008;197(1):1-10.
12. Lofberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, et al. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *Eur J Clin Invest.* 2002;32(5):345-53.
13. Seene T. Turnover of skeletal muscle contractile proteins in glucocorticoid myopathy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;50(1-2):1-4.
14. Minet-Quinard R, Moinard C, Walrand S, Villie F, Normand B, Vasson MP, et al. Induction of a catabolic state in rats by dexamethasone: dose or time dependency? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24(1):30-6.
15. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation

- of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(2):E363-71.
16. Fardet L, Petersen I, Nazareth I. Prevalence of long-term oral glucocorticoid prescriptions in the UK over the past 20 years. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50(11):1982-90.
  17. Caplan A, Fett N, Rosenbach M, Werth VP, Micheletti RG. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review: A review of glucocorticoid pharmacology and bone health. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(1):1-9.
  18. Pereira RM, Freire de Carvalho J. Glucocorticoid-induced myopathy. *Joint Bone Spine.* 2011;78(1):41-4.
  19. Lecker SH, Goldberg AL. Slowing muscle atrophy: putting the brakes on protein breakdown. *J Physiol.* 2002;545(3):729.
  20. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004;18(1):39-51.
  21. Satchek JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 2007;21(1):140-55.
  22. Fearon KC. Cancer cachexia and fat-muscle physiology. *N Engl J Med.* 2011;365(6):565-7.
  23. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle* 4. 2011;1 SRC - GoogleScholar.
  24. Senf SM, Dodd SL, Judge AR. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(1):C38-45.
  25. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.
  26. Kumar V, Atherton P, Smith K, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2009;106(6):2026-39.
  27. Macedo AG, Krug AL, Herrera NA, Zago AS, Rush JW, Amaral SL. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;143:357-64.
  28. Falduto MT, Czerwinski SM, Hickson RC. Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. *J Appl Physiol (1985).* 1990;69(3):1058-62.

29. Camera DM, Edge J, Short MJ, Hawley JA, Coffey VG. Early time course of Akt phosphorylation after endurance and resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(10):1843-52.
30. Taylor L, Midgley AW, Christmas B, Madden LA, Vince RV, McNaughton LR. The effect of acute hypoxia on heat shock protein 72 expression and oxidative stress in vivo. *Eur J Appl Physiol.* 2010;109(5):849-55.
31. Stary CM, Hogan MC. Cytosolic calcium transients are a determinant of contraction-induced HSP72 transcription in single skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120(10):1260-6.
32. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol (1985).* 2002;92(5):2177-86.
33. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, et al. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol (1985).* 2001;91(5):2205-12.
34. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Sugiura T, Dodd SL, Aoki J. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol (1985).* 2000;88(1):359-63.
35. Morimoto Y, Kondo Y, Kataoka H, Honda Y, Kozu R, Sakamoto J, et al. Heat treatment inhibits skeletal muscle atrophy of glucocorticoid-induced myopathy in rats. *Physiol Res.* 2015;64(6):897-905.
36. Kukreti H, Amuthavalli K, Harikumar A, Sathiyamoorthy S, Feng PZ, Anantharaj R, et al. Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *J Biol Chem.* 2013;288(9):6663-78.
37. Ogura Y, Naito H, Akin S, Ichinoseki-Sekine N, Kurosaka M, Kakigi R, et al. Elevation of body temperature is an essential factor for exercise-increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(5):R1600-7.
38. Akin S, Naito H, Ogura Y, Ichinoseki-Sekine N, Kurosaka M, Kakigi R, et al. Short-term treadmill exercise in a cold environment does not induce adrenal Hsp72 and Hsp25 expression. *J Physiol Sci.* 2017;67(3):407-13.
39. Lee JH, Jun HS. Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. *Front Physiol.* 2019;10:42.
40. Powers SK, Morton AB, Ahn B, Smuder AJ. Redox control of skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med.* 2016;98:208-17.
41. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280(17):4294-314.
42. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(4):C834-43.

43. White SL, Rawlinson W, Boan P, Sheppard V, Wong G, Waller K, et al. Infectious Disease Transmission in Solid Organ Transplantation: Donor Evaluation, Recipient Risk, and Outcomes of Transmission. *Transplant Direct*. 2019;5(1):e416.
44. Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;1:CD001046.
45. Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, et al. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(6):809-13.
46. Hasselgren PO, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg*. 2001;233(1):9-17.
47. Otis JS, Ashikhmin YI, Brown LA, Guidot DM. Effect of HIV-1-related protein expression on cardiac and skeletal muscles from transgenic rats. *AIDS Res Ther*. 2008;5:8.
48. al-Majid S, McCarthy DO. Cancer-induced fatigue and skeletal muscle wasting: the role of exercise. *Biol Res Nurs*. 2001;2(3):186-97.
49. Price SR, Gooch JL, Donaldson SK, Roberts-Wilson TK. Muscle atrophy in chronic kidney disease results from abnormalities in insulin signaling. *J Ren Nutr*. 2010;20(5 Suppl):S24-8.
50. Suzuki T, Palus S, Springer J. Skeletal muscle wasting in chronic heart failure. *ESC Heart Fail*. 2018;5(6):1099-107.
51. Overman RA, Yeh JY, Deal CL. Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(2):294-8.
52. Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*. 2003;9(8):344-50.
53. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):59-68.
54. von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol*. 2012;22(11):602-9.
55. Watt KI, Goodman CA, Hornberger TA, Gregorevic P. The Hippo Signaling Pathway in the Regulation of Skeletal Muscle Mass and Function. *Exerc Sport Sci Rev*. 2018;46(2):92-6.
56. Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(4):2737-44.

57. Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet.* 2001;27(2):195-200.
58. Spangenburg EE, Le Roith D, Ward CW, Bodine SC. A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol.* 2008;586(1):283-91.
59. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117 SRC - GoogleScholar:399-412.
60. Onodera J, Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31582-6.
61. Moarbes V, Mayaki D, Huck L, Leblanc P, Vassilakopoulos T, Petrof BJ, et al. Differential regulation of myofibrillar proteins in skeletal muscles of septic mice. *Physiol Rep.* 2019;7(20):e14248.
62. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2121-9.
63. Bartoli M, Richard I. Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):2115-33.
64. Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):2098-114.
65. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr.* 1999;129(1S Suppl):227S-37S.
66. Tawa NE, Jr., Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest.* 1997;100(1):197-203.
67. Sackey JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, FASEB. Rapid disuse and denervation atrophy invol, transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. 2007;21 SRC - GoogleScholar:140-55.
68. Milan G, Romanello V, Pescatore F, Armani A, Paik JH, Frasson L, et al. Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun.* 2015;6:6670.
69. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(6):E469-84.
70. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117(3):399-412.

71. Laghi F, Adiguzel N, Tobin MJ. Endocrinological derangements in COPD. *Eur Respir J*. 2009;34(4):975-96.
72. Burford NG, Webster NA, Cruz-Topete D. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation of Glucocorticoids in the Cardiovascular System. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
73. Gjerstad JK, Lightman SL, Spiga F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress*. 2018;21(5):403-16.
74. Kuo T, Harris CA, Wang JC. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;380(1-2):79-88.
75. Giron MD, Vilchez JD, Shreeram S, Salto R, Manzano M, Cabrera E, et al. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117520.
76. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 2004;14(3):395-403.
77. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*. 1988;22:631-77.
78. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286(3):433-42.
79. McArdle F, Spiers S, Aldemir H, Vasilaki A, Beaver A, Iwanejko L, et al. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J Physiol*. 2004;561(Pt 1):233-44.
80. Senf SM, Dodd SL, McClung JM, Judge AR. Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J*. 2008;22(11):3836-45.
81. Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Kakigi R, Sugiura T, Powers SK, Naito H. Heat stress protects against mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy. *J Appl Physiol (1985)*. 2014;117(5):518-24.
82. Gwag T, Park K, Kim E, Son C, Park J, Nikawa T, et al. Inhibition of C2C12 myotube atrophy by a novel HSP70 inducer, celastrol, via activation of Akt1 and ERK1/2 pathways. *Arch Biochem Biophys*. 2013;537(1):21-30.
83. Tsuchida W, Iwata M, Akimoto T, Matsuo S, Asai Y, Suzuki S. Heat Stress Modulates Both Anabolic and Catabolic Signaling Pathways Preventing Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy In Vitro. *J Cell Physiol*. 2017;232(3):650-64.
84. Kirschke E, Goswami D, Southworth D, Griffin PR, Agard DA. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell*. 2014;157(7):1685-97.

85. Atherton PJ, Smith K. Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. *J Physiol*. 2012;590(5):1049-57.
86. Hickson RC, Davis JR. Partial prevention of glucocorticoid-induced muscle atrophy by endurance training. *Am J Physiol*. 1981;241(3):E226-32.
87. Seene T, Kaasik P. Role of exercise therapy in prevention of decline in aging muscle function: glucocorticoid myopathy and unloading. *J Aging Res*. 2012;2012:172492.
88. Clemmons DR. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(7):349-56.
89. Glass DJ. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;346:267-78.
90. Milne KJ, Noble EG. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol (1985)*. 2002;93(2):561-8.
91. Sonobe T, Inagaki T, Poole DC, Kano Y. Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle in vivo: role of stretch-activated channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(4):R1329-37.
92. Ruell PA, Hoffman KM, Chow CM, Thompson MW. Effect of temperature and duration of hyperthermia on HSP72 induction in rat tissues. *Mol Cell Biochem*. 2004;267(1-2):187-94.
93. Fonseca CG, Pires W, Lima MR, Guimaraes JB, Lima NR, Wanner SP. Hypothalamic temperature of rats subjected to treadmill running in a cold environment. *PLoS One*. 2014;9(11):e111501.
94. Gwag T, Lee K, Ju H, Shin H, Lee JW, Choi I. Stress and signaling responses of rat skeletal muscle to brief endurance exercise during hindlimb unloading: a catch-up process for atrophied muscle. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24(5-6):537-46.
95. Tsuzuki T, Yoshihara T, Ichinoseki-Sekine N, Kakigi R, Takamine Y, Kobayashi H, et al. Body temperature elevation during exercise is essential for activating the Akt signaling pathway in the skeletal muscle of type 2 diabetic rats. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205456.
96. Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N, et al. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(3):H1346-52.
97. Hasselgren PO. Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999;2(3):201-5.
98. Schakman O, Kalista S, Barbe C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(10):2163-72.
99. Fappi A, Neves JC, Sanches LN, Massaroto ESPV, Sikusawa GY, Brandao TPC, et al. Skeletal Muscle Response to Deflazacort, Dexamethasone and Methylprednisolone. *Cells*. 2019;8(5).



100. Bloemberg D, Quadrilatero J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS One*. 2012;7(4):e35273.
101. Marmonti E, Busquets S, Toledo M, Ricci M, Beltra M, Gudino V, et al. A Rat Immobilization Model Based on Cage Volume Reduction: A Physiological Model for Bed Rest? *Front Physiol*. 2017;8:184.
102. Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Suita K, Fujita T, et al. Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128263.
103. Fappi A, Neves JC, Kawasaki KA, Bacelar L, Sanches LN, F PdS, et al. Omega-3 multiple effects increasing glucocorticoid-induced muscle atrophy: autophagic, AMPK and UPS mechanisms. *Physiol Rep*. 2019;7(1):e13966.
104. Herrera NA, Jesus I, Dionisio EJ, Dionisio TJ, Santos CF, Amaral SL. Exercise Training Prevents Dexamethasone-induced Rarefaction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017;70(3):194-201.
105. Tamura Y, Kitaoka Y, Matsunaga Y, Hoshino D, Hatta H. Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle. *J Physiol*. 2015;593(12):2707-20.
106. Konno S. Hydroxyl radical formation in skeletal muscle of rats with glucocorticoid-induced myopathy. *Neurochem Res*. 2005;30(5):669-75.
107. Liu J, Peng Y, Wang X, Fan Y, Qin C, Shi L, et al. Mitochondrial Dysfunction Launches Dexamethasone-Induced Skeletal Muscle Atrophy via AMPK/FOXO3 Signaling. *Mol Pharm*. 2016;13(1):73-84.
108. Eo H, Reed CH, Valentine RJ. Imoxin prevents dexamethasone-induced promotion of muscle-specific E3 ubiquitin ligases and stimulates anabolic signaling in C2C12 myotubes. *Biomed Pharmacother*. 2020;128:110238.