

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

**İSKELET KASINDA TÜM VÜCUT TİTREŞİMİ ve
İMMOBİLİZASYONUN PROTEİN SENTEZ ve YIKIMINDA
ROL OYNAYAN SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Şenay SULJEVİC

**Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2015**

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

**İSKELET KASINDA TÜM VÜCUT TİTREŞİMİ ve
İMMOBİLİZASYONUN PROTEİN SENTEZ ve YIKIMINDA
ROL OYNAYAN SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Şenay SULJEVİC

**Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2015**

Anabilim Dalı : Spor Bilimleri ve Teknolojisi
 Program : Spor Bilimleri ve Teknolojisi-Doktora
 Tez Başlığı : İskelet Kasında Tüm Vücut Titreşimi ve İmmobilizasyonun
 Protein Sentez veYıkımında Rol Oynayan Sinyal Yolakları
 Üzerine Etkisi
 Öğrenci Adı-Soyadı : Şenay SULJEVIĆ
 Savunma Sınavı Tarihi :13 Temmuz 2015

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof.Dr. Kamer KILINÇ
 (TOBB Ü. Tıp Fakültesi)

(İmza)

Tez danışmanı:

Prof. Dr. Ali Haydar DEMİREL
 (H.Ü. Spor Bil. Fak./Egzersiz ve Spor Bil.)

(İmza)

Üye:

Prof.Dr. Gülriz ERİŞGEN
 (TOBB Ekonomi ve Tekn. Ün./Tıp Fak.)

(İmza)

Üye:

Doç.Dr. Tahir HAZIR
 (H.Ü. Spor Bil. Fak./Egzersiz ve Spor Bil.)

(İmza)

Üye:

Yrd.Doç.Dr. Nazan KOŞAR
 (H.Ü. Spor Bil. Fak./Rekreasyon)

(İmza)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(İmza)
Prof.Dr. Ersin FADILLOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Danışmanım Sayın Prof. Dr. Haydar Demirel'in, öğrencisi olmanın akademik anlamda yüklediği sorumlulukları her zaman hatırlayacağımı bilmesini isterim. Lisansüstü eğitimim süresince katkılarından ötürü kendisine en içten saygılarımla teşekkür ederim.

Verilerin analizinde karşılaştığım bazı problemleri çözmem konusunda bana yol gösteren Sayın Hasan Fehmi Özdemir'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki katkıları için arkadaşım Dr. Gürhan Dönmez'e ve arkadaşlarım Tolga Atalar, Mustafa Özdemir, Zeynep Abalı ve Bircan Akdoğan'a her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Şenay Suljevic

ÖZET

Şenay, S. İskelet Kasında Tüm Vücut Titreşimi ve İmmobilizasyonun Protein Sentez ve Yıkımında Rol Oynayan Sinyal Yolakları Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015. İskelet kası atrofisi; immobilizasyon, denervasyon, yüksüzleştirme gibi kullanılmamaya bağlı olarak veya çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkan kas kitle ve kuvvet kaybı ile karakterize bir durumdur. Günümüzde kas atrofisinin önlenmesi için uygun bir girişim veya tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu çerçevede, son yıllarda artan sayıda çalışmanın kas kitle ve kuvvetini arttırdığı ifade ettiği tüm vücut titreşimi (TVT) dikkatleri çekmektedir. Diğer yandan TVT'nin bu etkiyi hangi mekanizmalar ile gerçekleştirdiği bilinmemektedir. Bu çalışma, iki haftalık immobilizasyon ve TVT'nin iskelet kası atrofi ve hipertrofi yolaklarında görev alan bazı sinyal molekülleri üzerine etkisini değerlendirmek amacı ile yapılmıştır. Dört aylık dişi Wistar sıçanlar kontrol (K), iki haftalık immobilizasyon (İ), bir haftalık remobilizasyon (İR), bir haftalık remobilizasyon sırasında TVT (İT) ve yalnızca bir hafta TVT (T) uygulaması olmak üzere beş farklı gruba (n=6, her grup) ayrılmıştır. İmmobilizasyon, plantar fleksiyonda bilateral alçılama yoluyla, TVT ise 45Hz, 3mm genlik ve dördüncü günden itibaren 20dk süreli aralıklı olarak toplam bir hafta boyunca uygulanmıştır. Soleus kası izole edilerek; MuRF1, MAFbx, FoxO1, FoxO3a, miyostatin, Akt1, mTOR, p70S6K ve AMPK'ye ilişkin gen ekspresyonları ile MuRF1, MAFbx, p-FoxO3a, p- ve total AMPK, p-Akt ve mTOR ile Hsp72 ve Hsp25 protein miktarları belirlenmiştir. İ grubunda Soleus /vücut ağırlığı oranı K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0,05). K grubu ile karşılaştırıldığında alçı gruplarında MuRF1 gen ekspresyonunda bir azalma görülürken (p<0,05), diğer genlerin mRNA düzeylerinde gruplar arasında fark bulunmamıştır (p>0,05). Diğer yandan p-FoxO3a ve p-4EBP1'in İ, İR ve İT gruplarında (p<0,05), mTOR ve p-Akt1 ise sadece İ grubunda azalma göstermiştir (p<0,05). MAFbx ve MuRF1 düzeyleri İ grubunda K grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0,05). p-AMPK/AMPK oranı İ grubunda K ve İT gruplarına göre daha düşük bulunmuştur (p<0,05). Son olarak, immobilizasyon Hsp72 düzeylerinde anlamlı bir düşüşe yol açarken (p<0,05), İR grubunda bu değerler K grubuna yükselmiş, İT grubundaki yükselme ise İR grubunun gerisinde kalarak K ve İR grubundan düşük bulunmuştur (p<0,05). Hsp25 düzeylerinin ise İR ve İT gruplarında K grubunda göre arttığı görülmüştür (p<0,05). Bu sonuçlar iki haftalık alçı uygulaması yoluyla gerçekleştirilen immobilizasyonun kas atrofisinde kilit rol oynayan sinyal moleküllerinin protein düzeyinde artışlara, protein sentez yolağında rol alan moleküllerin düzeyinde ise azalmaya yol açtığını göstermiştir. Diğer yandan, moleküler etki mekanizmaları ilk kez bu çalışmayla incelenen TVT'nin uyguladığımız frekans genlik ve sürede sadece remobilizasyon döneminde yapılan uygulama ile sınırlı kalan bir etkisinin olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: İmmobilizasyon, Remobilizasyon, Tüm Vücut Titreşimi, Atrofi, Soleus.

ABSTRACT

Şenay, S. The Effects of Whole Body Vibration and Immobilization on Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis and Degradation. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Sports Sciences and Technology, Ankara, 2015. In addition to disuse such as immobilization, denervation and hindlimb suspension, some physiologic and pathologic conditions result in skeletal muscle atrophy. Although atrophy is an important clinical problem, there are no known therapeutic interventions. Recently, there is a growing interest on Whole Body Vibration (WBV) which has shown to increase muscle mass, strength and balance. The molecular mechanisms of the effect of WBV on skeletal muscle are unknown. This study was designed to elucidate the effects of immobilization, remobilization and WBT on signaling pathways involved in muscle atrophy and hypertrophy. Four months old female Wistar Albino rats randomly divided to five groups (n=6 each group): Control (C), two weeks of immobilization (I), immobilization followed by one week of remobilization (IR), immobilization followed by one week of remobilization and WBV (IRV) one week of WBV (WBV). Bilateral casting was done at plantar flexion position. One week of WBV was done at 45Hz and 3mm amplitude reaching 20min of daily duration at day 4th. Following experimental procedure, soleus muscles were isolated. Gene expressions of MuRF1, MAFbx, FoxO1, FoxO3a, myostatin, Akt1, mTOR, p70S6K and AMPK were evaluated by using RTPCR. Protein levels of MuRF1, MAFbx, p-FoxO3a, p- AMPK/AMPK ratio, p-Akt, mTOR, Hsp72 and Hsp25 were analyzed by immunoblotting. Soleus/Body weight ratio decreased in group I compare to group C. MuRF1 gene expressions of groups of I, IR and IRV significantly lower than that of group C (p<0.05). There were no significant differences among groups in terms of FoxO1, FoxO3a, MAFbx and myostatin gene expression (p>0.05). Protein levels of p-FoxO3a and p-4EBP1 were significantly lower in groups I, IR and IRV compare to group C (p<0.05). In addition, p-FoxO3a levels in group I was lower than that of group IRV (p<0.05) and the levels of p-4EBP1 was lower in group I compare to groups IR, IRV and WBV (p<0.05). mTOR and p-Akt1 protein levels were lower in group I compare to others (p<0.05). Both MAFbx and MuRF1 levels were higher in group I compare to groups C and IRV (p<0.05). Ratio of p-AMPK/AMPK was lower in group I compare to groups C and IRV. In terms of HSP expression, Hsp72 levels were lower in group I compare to all other groups (p<0.05). Hsp25 levels have tend to decrease in group I but it was not significantly different than group C (p>0.05). On the other hand, the levels of Hsp25 were higher in groups IR and IRV compare to groups C, I and WBV. These findings show that two weeks of immobilization resulted in decrease in the protein expressions of the molecules involved in protein synthesis an increase in the protein levels of the molecules involved in protein degradation. It seems that WBT with the duration, frequency and amplitude used in this study has limited effect on signal transduction pathways involved in both protein synthesis and degradation since only the regulation of p-4EBP1, MuRF1 and MAFbx were affected in IRV group.

Key words: Immobilization, Remobilization, Whole Body Vibration, Atrophy, Soleus, skeletal muscle

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Hipotezler	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kas Kitlesini Düzenleyen Moleküler Mekanizmalar	6
2.1.1. IGF1-PI3K-Akt-mTOR Sinyal Yolağı	6
2.1.2. Miyostatin-Smad2/3 Sinyal Yolağı	9
2.2. Kas Atrofisi ve Moleküler Mekanizmaları	9
2.2.1. Atrofi Sürecinde Ubikülin-proteozom Sistem ve Lizozomal Yolak	11
2.2.2. Atrofi Sürecinde Miyostatin Yolağı	13
2.3. AMPK ve İskelet Kası Atrofisindeki Olası Rolü	16
2.4. İmmobilizasyon Sonrası Toparlanma Sürecine İlişkin Yaklaşımlar	18
2.5. İskelet Kası Sıcak Şoku Proteinleri	19
2.6. Tüm Vücut Titreşimi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Araştırma Grubu	26
3.1.1. Deney grupları	26
3.2. DENEY PROTOKOLLERİ	28
3.2.1. İmmobilizasyon	28
3.2.2. Tüm Vücut Titreşimi	28
3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ	29
3.3.1. Doku İzolasyonu	29
3.3.2. RNA İzolasyonu	30
3.3.3. RNA Konsantrasyon Belirlenmesi	30
3.3.4. cDNA Sentezi	30
3.3.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	31
3.3.6. Protein analizi	32
3.3.7. Western Blot Analizi	32
3.3.8. Verilerin Analizi	33

4. BULGULAR	35
4.1. Vücut ve Kas Ağırlıkları Bulguları	35
4.2. Gen Ekspresyonu Bulguları	38
4.3. Protein Analizi Bulguları	51
5. TARTIŞMA	67
5.1. Deneysel Desenin Eleştirisi	71
5.2. Soleus kası atrofisi	73
5.3. FoxO, MAFbx ve MuRF1 Bulguları	76
5.4. Akt1, mTOR, 4EBP1 ve p70S6K bulguları	80
5.5. Miyostatin-Smad2/3 Sinyal Yolağı	82
5.6. AMPK düzeyleri ve İmmobilizasyon	83
5.7. Hsp72 ve Hsp25 düzeyleri	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR	95

SİMGELER ve KISALTMALAR

Akt	Protein kinaz B
AMPK	5' adenosin monofosfatın aktive ettiği protein kinaz
FoxO1	Forkhead box O1
FoxO3a	Forkhead box O3a
HSP	Sıcak şoku proteinleri
IGF1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
MAFbx	Atrogin-1 (Muscle atrophy F-box)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuRF1	Muscle RING-finger protein-1
p70S6K	70 kDa ribosomal protein S6 kinaz
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinaz
RNA	Ribonükleik asit
TVT	Tüm vücut titreşimi
4E-BP1	Ökaryotik elongasyon faktörü bağlayan protein 1
TGF β	Dönüştürücü büyüme faktörü β

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Kas protein dengesini düzenleyen sinyal yolakları.	8
2.2. FoxO transkripsiyon faktörlerinin Akt tarafından düzenlenmesi.	11
2.3. Miyostatin yolağının IGF-1 yolağı ile ilişkisi.	15
2.4. Kas hücresinde de protein sentezi ve degradasyonlarına yol açan ana yolaklar.	17
3.1. Deneysel planlama.	27
3.2. Alçı uygulaması.	29
3.3. TVT uygulaması.	29
4.1. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 1. amplifikasyon grafiğı.	38
4.2. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 2. amplifikasyon grafiğı.	38
4.3. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 3. amplifikasyon grafiğı.	39
4.4. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 4. amplifikasyon grafiğı.	39
4.5. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 5. amplifikasyon grafiğı.	40
4.6. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 6. amplifikasyon grafiğı.	40
4.7. FoxO1 ve p70S6K genleri için 1. amplifikasyon grafiğı.	41
4.8. FoxO1 ve p70S6K genleri için 2. amplifikasyon grafiğı.	41
4.9. İmmobilizasyon ve TVT'nin miyostatin gen ekspresyonu üzerine etkisi.	42
4.10. İmmobilizasyon ve TVT'nin MuRF1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.	44
4.11. İmmobilizasyon ve TVT'nin MAFbx gen ekspresyonu üzerine etkisi.	45
4.12. İmmobilizasyon ve TVT'nin FoxO1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.	46
4.13. İmmobilizasyon ve TVT'nin FoxO3a gen ekspresyonu üzerine etkisi.	47
4.14. İmmobilizasyon ve TVT'nin Akt1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.	48
4.15. İmmobilizasyon ve TVT'nin mTOR gen ekspresyonu üzerine etkisi.	49
4.16. İmmobilizasyon ve TVT'nin p70S6K gen ekspresyonu üzerine etkisi.	50

4.17.	İmmobilizasyon ve TVT'nin AMPK gen ekspresyonu üzerine etkisi.	51
4.18.	İmmobilizasyon ve TVT'nin MuRF1 protein düzeyleri üzerine etkisi.	52
4.19.	MuRF1 Western Blot görüntüleri.	52
4.20.	İmmobilizasyon ve TVT'nin MAFbx protein düzeyleri üzerine etkisi.	54
4.21.	MAFbx Western Blot görüntüleri.	54
4.22.	İmmobilizasyon ve TVT'nin p-FoxO3a protein düzeyleri üzerine etkisi.	55
4.23.	p-FoxO3a Western Blot görüntüleri.	56
4.24.	İmmobilizasyon ve TVT'nin p-Akt1 protein düzeyleri üzerine etkisi.	57
4.25.	p-Akt1 Western Blot görüntüleri.	57
4.26.	İmmobilizasyon ve TVT'nin mTOR protein düzeyleri üzerine etkisi.	59
4.27.	mTOR Western Blot görüntüleri.	59
4.28.	İmmobilizasyon ve TVT'nin p-4EBP1 protein düzeyleri üzerine etkisi.	60
4.29.	p-4EBP1 Western Blot görüntüleri.	61
4.30.	İmmobilizasyon ve TVT'nin AMPK fosforilasyonu üzerine etkisi.	62
4.31.	p-AMPK ve AMPK Western Blot görüntüleri.	62
4.32.	İmmobilizasyon ve TVT'nin Hsp72 protein düzeyleri üzerine etkisi.	64
4.33.	Hsp72 Western Blot görüntüleri.	64
4.34.	İmmobilizasyon ve TVT'nin Hsp25 protein düzeyleri üzerine etkisi.	66
4.35.	Hsp25 Western Blot görüntüleri.	66

TABLOLAR

	Sayfa
3.1. TVT uygulama planı.	29
3.2. cDNA sentezi için gereken reaktif hacimleri.	31
3.3. cDNA sentezi için uygulanan termal döngü protokolü	31
3.4. Blotlama işleminde kullanılan birincil antikolar	33
4.1. Deney hayvanları vücut ağırlıkları.	36
4.2. Soleus kas ağırlıkları ve vücut ağırlıklarına oranları.	37
4.3. Tüm grupların Soleus kas ağırlığı karşılaştırmaları.	37
4.4. Tüm grupların Soleus/VA karşılaştırmaları.	37
4.5. Miyostatin gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	42
4.6. MuRF1 gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	43
4.7. MuRF1 gen ekspresyon düzeylerinin grup karşılaştırmaları.	43
4.8. MAFbx gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	44
4.9. FoxO1 gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	45
4.10. FoxO3a gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	46
4.11. Akt gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	47
4.12. mTOR gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	48
4.13. p70S6K gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	49
4.14. AMPK gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.	50
4.15. Tüm grupların MuRF1 optik dansite yüzdeleri.	51
4.16. Tüm grupların MuRF1 optik dansite karşılaştırmaları.	52
4.17. Tüm grupların MAFbx optik dansite yüzdeleri.	53
4.18. Tüm grupların MAFbx optik dansite karşılaştırmaları.	53
4.19. Tüm grupların p-FoxO3a optik dansite yüzdeleri.	54
4.20. Tüm grupların p-FoxO3a optik dansite karşılaştırmaları.	55
4.21. Tüm grupların p-Akt1 optik dansite yüzdeleri.	56
4.22. Tüm grupların p-Akt1 optik dansite karşılaştırmaları.	56
4.23. Tüm grupların mTOR optik dansite yüzdeleri.	58
4.24. Tüm grupların mTOR optik dansite karşılaştırmaları.	58
4.25. Tüm grupların p-4EBP1 optik dansite yüzdeleri.	59
4.26. Tüm grupların p-4EBP1 optik dansite karşılaştırmaları.	60
4.27. Tüm grupların p-AMPK/AMPK optik dansite yüzdeleri.	61
4.28. Tüm grupların p-AMPK/AMPK optik dansite karşılaştırmaları.	61
4.29. Tüm grupların Hsp72 optik dansite yüzdeleri.	63
4.30. Tüm grupların Hsp72 optik dansite karşılaştırmaları.	63
4.31. Tüm grupların Hsp25 optik dansite yüzdeleri.	64
4.32. Tüm grupların Hsp25 optik dansite karşılaştırmaları.	65

1. GİRİŞ

Kullanmamaya bağılı kas atrofisi; kanser kaşeksisi, böbrek yetmezliğı, kalp yetmezliğı diyabet, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, inme gibi kronik hastalık koşulları yanı sıra sarkopeni, spinal kord yaralanması, periferik sinir zedelenmesi veya büyük operasyonlar sonrası nekahat dönemlerinde özellikle vücut ağırlığını taşıyan bacak kaslarında olmak üzere genel olarak düzenli kontraksiyona katılmayan iskelet kaslarında ortaya çıkmaktadır. Hareketsiz bir yaşamın eşlik ettiğı söz konusu kronik hastalıklara düşük dereceli inflamasyon eşlik eder ve IL6, IL8, IL10 gibi çeşitli miyokinler yanı sıra glukokortikoidler, TNFalfa ve CRP gibi proteinlerin konsantrasyonlarında artış meydana gelir (74). Bu artışlardan özellikle IL6 ve TNF alfa, iskelet kası atrofisini de beraberinde getirir (72, 42). Hastalık durumunda yaşam süreci ve kalitesinin uzatılması, kas kaybının önüne geçilmesi ve kas kitle ve kuvvetinin arttırılması için amino asit takviyesi, anabolik ilaçlar veya direnç antrenmanları gibi çeşitli uygulamalar ortaya konmuştur.

Diğer yandan, çeşitli spor yaralanmaları veya ortopedik problemler nedeniyle belirli bir ekstremitenin alçı veya atele alınarak immobilize edildiğı durumlarda da ilgili ekstremitede kullanmamaya bağılı atrofi gözlenir. Oluşan kas kitlesi ve kuvvet kaybı, immobilizasyon ortadan kalktıktan sonraki dönemde sporcunun spor yaşamına, diğer bireylerin normal iş yaşamına dönme süreçlerinde gecikmelere neden olur. Bu sürecin kısaltılması gerek ekonomik ve gerekse sosyal açıdan önem taşımaktadır.

Kullanmama koşullarında ortaya çıkan kas atrofisi, yaş, fizyolojik fonksiyon, ilgili kasın lif özellikleri ve kullanmamanın derecesine bağılı olarak değişiklikler gösterir (16). Diğer yandan, büyüme ve gelişme, mekanik yükün varlığı, direnç antrenmanları, büyüme hormonları ve anabolik steroidler, kas lif çapı ve kas kitlesini geliştirerek kas hipertrofisini oluşturur (172). Kas kitlesinin boyutu, kas hücresinde protein sentezi ve degradasyonu arasındaki dengeye bağılıdır. Bu dengede, sentezin artması veya yıkımın azalması hipertrofiye, yıkımın artması veya sentezin azalması ise atrofiye yol açar (26). Kullanmama sürecinde ortaya çıkan kas protein kaybında rol alan moleküler mekanizmalar ile bu kaybın engellenmesi, azaltılması veya kas protein sentezinin arttırılmasına

ilişkin moleküler mekanizmaların aydınlatılması çeşitli hastalıklar ve çevresel koşullar nedeniyle oluşan kas kitle ve kuvvet kaybının önlenmesi yanı sıra, oluşan kayıpların daha hızlı ve doğru bir şekilde tedavi ve rehabilitasyonu için yöntemler geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Kullanmamaya bağlı kas atrofisi oldukça yaygın bir problem olmasına karşın, bu sorunun çözümü için kabul görmüş iyi bir ilaç veya tedavi modalitesi söz konusu değildir. Bu çerçevede sadece direnç egzersizleri kas atrofisi sonrası toparlanma döneminde kas kitle ve kuvvetini iyileştirmede rol oynamakta olup, bunun için gereken şiddette egzersizin yapılabilmesi her zaman mümkün olamamaktadır. Son yıllarda tüm vücut titreşimi (TVT)'nin nöromusküler adaptasyonlar yolu ile kasın ürettiği güç ve dayanıklılıkta artış meydana getirerek direnç egzersizlerine benzer bir etki gösterdiği bildirilmiştir (20). Özellikle TVT uygulamasının yaşlı kadın ve erkeklerde kas hipertrofisine de yol açtığına gösterilmesi (112). Yeterli şiddette direnç egzersizi yapmanın risk oluşturduğu durumlar ve yaşlılıkta TVT'nin kas kitle ve fonksiyonun korunması için uygun bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer yandan, TVT'nin iskelet kasında kitle artışına neden olan sinyal yolları üzerine etkisi net olarak bilinmemektedir. TVT'nin iskelet kas atrofisinde rol oynayan sinyal yolları üzerine etkisinin aydınlatılması, özellikle alçı, atel veya ameliyat gibi atrofiye neden olan koşullarda ve belki de sarkopeni gibi yaşa bağlı kas kitle ve kuvvet kaybında tedavi ve rehabilitasyon modalitelerinin belirlenmesi açısından da önem taşımaktadır.

İskelet kası atrofisi ve hipertrofisi, çok sayıda molekülün birbiri ile etkileşim içerisinde rol aldığı çeşitli sinyal yollarının oldukça kompleks bir iş birliği ile gerçekleşir. İskelet kası hipertrofisinde yer alan iki temel sinyal yolağından birisi, pozitif rol oynayan IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR yolağı, diğeri ise negatif düzenleyici olan myostatin-Smad2/3 yolağıdır. Bu yollarda yer alan bazı moleküller, yolların genel aktivasyonu konusunda bilgi vermesi açısından ayrı bir önem taşır (186). Bunların içerisinde Akt, protein sentezini mTOR ve daha sonraki basamaklarda rol alan 4E-BP1 ve p70S6K üzerinden uyarırken FoxO transkripsiyon faktörü aracılığı ile de protein degradasyonunu kontrol eder. Öyle ki, aktif Akt1 FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu

engeller (57). Böylece MuRF1 ve atrogin-1/MAFbx ekspresyonu inhibe olur (4). Diğer yandan AMPK, mTOR aktivitesini inhibe ederek kas hipertrofisini önler (172). Negatif düzenleyici yolak olan miyostatin-Smad2/3 yolağı protein degradasyonundan sorumludur. mTOR, miyostatin yolağındaki Smad2'yi baskılayarak degradasyona engel olurken, aynı zamanda 4E-BP1 fosforilasyonunu düzenleyerek protein sentezini hızlandırır. Dolayısıyla sadece tek taraflı bir sinyal yolağında rol alan moleküllerin değerlendirilmesi resmin tamamının anlaşılmasını mümkün kılmamaktadır. Buradan anlaşılacağı üzere, Akt1, mTOR, 4E-BP1, p70S6K, AMPK, FoxO3, FoxO1, MuRF1, atrogin-1/MAFbx, miyostatin iskelet kası atrofisi ve hipertrofisinde içerilen temel moleküller olup bu çalışmada da incelenen moleküllerdir.

Alçı veya atel yoluyla oluşan immobilizasyon gerek spor yaralanmalarında ve gerekse diğer ortopedik yaralanmalarda sıklıkla yapılan bir uygulamadır. Söz konusu immobilizasyon sürecinde rol oynayan moleküler mekanizmalar yanı sıra alçı sonrası remobilizasyonda bu mekanizmalarda meydana gelen değişikliklerin değerlendirilmesi tedavi modalitelerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu çerçevede son yıllarda oldukça sık rastlanan TVT uygulamasının remobilizasyon dönemindeki etkinliği de merak konusudur.

Diğer yandan sıcak şoku proteinlerinde 70 kDa ailesinin indüklenebilir üyesi olan Hsp72 ve Hsp25 iskelet kas hücrelerinde koruyucu rol üstlenmektedir. Artmış Hsp72 düzeyleri kuyruktan asma yoluyla oluşturulan soleus atrofisini %50 oranında azalttığı (130), immobilizasyon sonrası remobilizasyonda miktarlarının arttığı ve toparlanmada rol alabileceği bildirilmiştir (190). Artmış Hsp27 (Hsp 25'in insanda bulunan formu) düzeylerinin ekzentrik egzersizlerle oluşan kas hasarından hücreyi koruduğu (147) bildirilmiştir. Bu bulgular immobilizasyon atrofisinde Hsp25 ve Hsp72'nin miktarının azalabileceği ve remobilizasyon döneminde ise miktarlarının artacağı ve kas dokusunun toparlanma sürecine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, alçı yoluyla oluşturulan immobilizasyon ve TVT uygulamasının Hsp25 ve Hsp72'nin protein düzeyindeki ekspresyonu da değerlendirilmiştir.

Amaç:

Bu çalışmanın amacı immobilizasyon ve TVT uygulamasının iskelet kası atrofi ve hipertrofi yolaklarında rol oynayan moleküller üzerine etkisini değerlendirmektir. Çalışmada ayrıca immobilizasyon sonrası bir haftalık remobilizasyon sürecinde bu moleküllerin aktivasyon ve düzeylerinin nasıl değiştiği ve bu süreçte TVT uygulamasının toparlanmaya moleküler düzeyde etkisinin olup olmadığının araştırılması da amaçlanmıştır.

Böylece çalışmada, Akt1, mTOR, 4E-BP1, p70S6K, AMPK, FoxO3a, FoxO1, MuRF1, atrogin-1/MAFbx, miyostatinin mRNA düzeyleri yanı sıra, MuRF1, atrogin-1/MAFbx, fosforile ve fosforile olmayan AMPK, fosforile FoxO3a, Akt ve mTOR ile Hsp72 ve Hsp25 protein düzeyleri de incelenmiştir. Çalışmada immobilizasyon modeli olarak iki haftalık alçı kullanılmıştır.

Hipotez 1:

Alçılama yoluyla oluşturulan iki haftalık immobilizasyon soleus kasında atrofiye yol açar. Bu atrofiye, protein sentezinde rol alan proteinlerin mRNA ve protein düzeylerindeki azalma ve protein yıkımında rol alan moleküllerin ise mRNA ve protein düzeylerinde artış eşlik eder. Stres proteinleri düzeylerinde ise azalma söz konusu olacaktır.

Hipotez 2:

TVT, soleus kasında protein sentezinde rol alan proteinlerin mRNA ve protein düzeylerindeki artma ve protein yıkımında rol alan moleküllerin ise mRNA ve protein düzeylerinde azalmaya yol açar. Stres proteinleri düzeylerinde ise artış söz konusu olacaktır.

Hipotez 3:

İki haftalık alçı yoluyla oluşturulan immobilizasyon sonunda uygulanan bir haftalık TVT protein sentezinde rol alan proteinlerin mRNA ve protein düzeylerindeki artma ve protein yıkımında rol alan moleküllerin ise mRNA ve protein düzeylerinde azalmaya yol açarak toparlanmaya katkıda bulunur. Bu dönemde TVT uygulaması sadece remobilizasyona göre stres proteinleri olan Hsp72 ve Hsp25 düzeylerinde artışa yol açacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Vücut ağırlığının yaklaşık %40'ını oluşturan iskelet kasları, insan vücudundaki en büyük doku olarak bilinmektedir. İskelet kasları, güç üretimi, hareket ve nefes almadan sorumlu olmanın yanı sıra; glisemik kontrol, metabolik genlerin regülasyonu ve metabolik homeostazın sağlanmasında kritik bir rol üstlenmektedir (56). Gerçekten de, sağlıklı bir kas kitlesinin varlığı stres koşullarında gereken enerjinin hayati organlara ulaştırılmasında olduğu gibi, insülin direnci, obezite ve tip II diyabet (12) gibi metabolik hastalıklardan korunma açısından da son derece önemlidir. Bunlara ek olarak, son on yıl içerisinde kas kasılması sırasında iskelet kaslarından çok sayıda sitokin salgıladığı ortaya konmuş ve bu sitokinler '*miyokin*' olarak tanımlanmıştır (150). Böylece kontraksiyon yolu ile iskelet kasından salınan miyokinlerin diğer doku ve organların metabolizmasına etki ettiğine ilişkin çalışmalar sonucunda, iskelet kasının bir endokrin organ olduğu düşüncesi giderek kabul görmüştür (149).

İskelet kası normal koşullarda oldukça stabil bir miyofibriler protein yapım/yıkım dengesine sahiptir (179). Ancak bu denge, organizmadaki fizyolojik ve patolojik koşullara uyum sağlamak için pozitif ya da negatif yönde değişmektedir. İskelet kası, mekanik yükün artması ve anabolik hormon stimülasyonuna kas kitlesinde artışla (hipertrofi), mekanik yükün azalması ve katabolik hormon salınımındaki artışa da kas kitlesinde azalmayla (atrofi) yanıt vermektedir (172). Örneğin; egzersiz, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve dallı zincirli amino asitler (BCAA), veya büyüme hormonları gibi anabolik uyarıcılar protein sentezini indükleyip protein yıkımını baskılayarak iskelet kasında hipertrofiye neden olmaktadır. İnaktivite, mekanik yükün ortadan kalkması ve denervasyon gibi stresler ya da kanser kaşeksisi, sepsis, diyabet, kalp yetmezliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi hastalıklar ise iskelet kasında proteolizi tetikler ve atrofiye neden olur (153). Nitekim, atrofi sürecinde %60'ını kas proteinlerinin oluşturduğu miyofibriler sistem elemanlarının, çözünebilir proteinlere göre çok daha fazla azaldığı ve kas kitle kaybına neden olduğu bildirilmiştir (41).

2.1. Kas Kitesini Düzenleyen Moleküler Mekanizmalar

Kas kitesi ve lif boyutunun düzenlenmesi, kas hücresindeki protein döngüsünü ifade eden protein sentez/yıkım dengesine bağlıdır. Hücre, herhangi bir strese maruz kaldığında adaptasyonun sağlanması için bazı moleküller tarafından uyarılır. Molekülün kendisine spesifik reseptörü ile etkileşimi, mesajın hücre içerisine iletimini sağlar. Böylece, birçok sinyal molekülünün görev aldığı yolların aktivasyonu ya da inhibisyonu ile transkripsiyon ve protein sentezi düzenlenir (65). Kas lifinde protein dengesini kontrol eden iki ana sinyal yolağı vardır. İnsulin benzeri büyüme faktörü1-fosfatidilinozitol-3-kinaz-Akt-rapamisin kompleksinin memeli hedefi (IGF1-PI3K-Akt-mTOR) yolağı kas gelişiminde pozitif düzenleyici olarak rol oynarken, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) ailesinin bir elemanı olan miyostatin yolağı tam tersi bir mekanizma ile çalışarak protein sentezini baskılar.

2.1.1. IGF1-PI3K-Akt-mTOR Sinyal Yolağı

IGF-1, iskelet kasında görev alan anabolik yollar için son derece önemli bir düzenleyicidir. IGF-1'in hücre zarı reseptörüne bağlandıktan sonra PI3K'yi aktive ederek sinyali hücre içerisine aktarması, protein sentezinin aktivasyonu için bir başlangıçtır (38). Bu basamaktan sonra PI3K tarafından fosforillenen Akt, bu yolağın diğer bir elemanı olan mTOR'u aktifleştirir ve protein sentez hızı artar (Şekil 2.1). Hücre kültürü ve hayvan iskelet kası üzerinde yapılan çalışmalar ile bu yolak fonksiyonlarını arttıran veya azaltan genetik uygulamalar, IGF-1'in kas gelişimi ve rejenerasyonundaki önemini desteklemektedir (171). Örneğin, kasa spesifik IGF-1 reseptörü inaktivasyonunun kas gelişimini negatif yönde etkileyerek kas lif sayısı ve boyutunda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (120). Benzer şekilde sistemik yolla IGF1 enjeksiyonu kas protein sentezini arttırır ve protein degradasyonunu inhibe eder (205). Ayrıca, transgenik farelerde kasa spesifik IGF-1'in aşırı ekspresyonu kas kitesini arttırmış ve buna kas kuvvetindeki artış da eşlik etmiştir (42, 127). Viral aracılı IGF1 gen ekspresyonunun hem genç hem de yaşlı sıçanlarda kontrol bacağına göre ekstensor digitorum longus kas kitle ve kuvvetini arttırdığı ve kuvvet artışının gençlerde %15 düzeyindeyken, yaşlılarda %27'ye ulaştığı görülmüş ve diğer bacakla

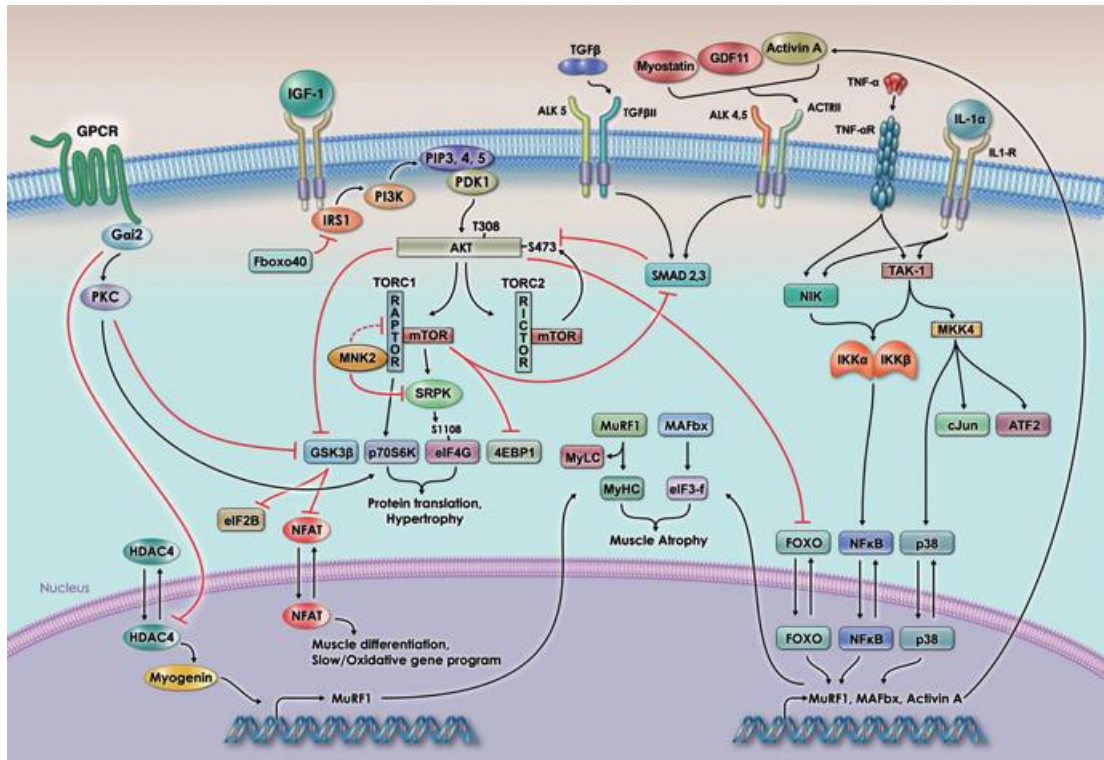
karşılaştırıldığında yaşlanma ile gözlenen tip II kas lifi kaybının tamamen düzeldiği ve 27 aylık fare EDL kası tip II lif sayısının 6 aylık fare düzeyinde olduğu gösterilmiştir (11).

IGF-1 yolağının iki elemanı Akt ve mTOR, kas hücresinde protein döngüsü açısından son derece kritik bir öneme sahiptir (101). Lai ve diğerleri (2004), yapısal olarak aktif Akt formuna sahip transgenik farelerde, Akt aktivasyonunun *in vivo* indüklenmesinin hipertrofiyi tetiklemede yeterli olduğunu ve bu aktivasyona sonraki basamaklarda yer alan p70S6K (p70S6 kinaz) aktivasyonun da eşlik ettiğini göstermişlerdir (98). mTOR, Akt'nin aşağı akımında yer alır ve Akt tarafından aktive edilir. Böylece hedef moleküller olan 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) ve 70kDa ribosomal protein S6K1'i uyararak translasyonun artmasını sağlar (100). Normal koşullarda 4EBP1 eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E)'e bağlanarak translasyonu inhibe ederken, mTOR'un 4EBP1'i fosforile etmesi ile eIF4E aktif hale gelir (64).

Translasyonu kontrol eden bir diğer önemli sinyal molekülü olan ökaryotik elongasyon faktörü 2 (eEF2) ise, mTOR tarafından p70S6K üzerinden indirekt olarak regüle edilir (193). mTOR yolağının kasa etki eden yük arttığında hemen aktive olduğu ve toparlanma periyodunda bir saat içinde protein sentezini arttırdığı bildirilmiştir (22). Eğer direnç egzersizlerinden önce mTOR inhibe edilirse, protein sentezinin engellendiği gösterilmiştir (96). Bodine ve diğerleri (2001), Akt/mTOR yolağının hipertrofide up-regüle, kullanmamaya bağlı atrofiye ise down-regüle olduğu, dahası farklı hipertrofi modellerinde rapamisin ile bloke edilen mTOR'un kasta hipertrofiyi %95 oranında engellediğini göstermiştir (18). Bu ve benzeri çalışmalar, mTOR'un aktivasyonunun hipertrofik yanıtta ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Böylece, Akt/mTOR yolağı aktivasyonu ve bu yolağın sonraki basamaklarında yer alan p70S6K ve 4E-BP1'in kas lif boyutunun regülasyonunda net bir şekilde rol aldığı ve Akt/mTOR yolağı aktivasyonunun kullanmamaya bağlı atrofiyi engellediği ortaya konmuştur (18).

Akt ve mTOR, farklı hücresel süreçler ile ilişkili olmaları açısından da iskelet kas protein döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Akt, mTOR aracılığı ile protein sentezini, FoxO (Forkhead box) transkripsiyon faktörleri aracılığı ile de protein degradasyonunu kontrol eder (128). mTOR ise,

protein degradasyonundan sorumlu olan miyostatin yolağındaki Smad2'yi baskılayarak degradasyona engel olurken, aynı zamanda 4E-BP1 fosforilasyonunu düzenleyerek protein sentezini hızlandırır (57). Şekil 2.1'de Akt/mTOR yolağı ve yukarıda bahsedilen p70S6K ve 4E-BP1 aktivasyonu, Akt'nin FoxO'yu inhibisyonu ve mTOR'un Smad2 üzerinden miyostatin yolağını baskılaması gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kas protein dengesini düzenleyen sinyal yolları (57).

2.1.2. Miyostatin-Smad2/3 Sinyal Yolağı

Kas gelişimini kontrol eden ikinci ana yolak (Şekil 2.3), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) ailesinin bir üyesi olan miyostatin (GDF-8)'dir. İskelet kası tarafından sentezlenen miyostatin, hücre zarındaki aktivin reseptör tip IIB (ActRIIB)'ye bağlanarak protein döngüsünü negatif yönde düzenlemektedir (103, 104). Miyostatinin ActRIIB'ye bağlanması ile aktifleşen Smad2 (*mothers against decapentaplegic homolog*) ve Smad3, Akt fosforilasyonunu baskılar. Akt normal koşullarda protein sentezini korumak üzere FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu engeller. Bu transkripsiyon faktörleri aktif durumdayken, MuRF1 (muscle ring finger-1) ve atrogen-1 olarak da adlandırılan MAFbx (muscle atrophy F-box) isimli iskelet kasına spesifik iki ubikitin ligazın ekspresyonunu sağlar (37). Akt'nin yeteri kadar fosforile olmaması, FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu engelleyemeyeceği için, FoxO aktivasyonunu sürdürür ve MuRF1 ile MAFbx ekspresyonu artar (4). Böylece, bir yandan protein sentezinin azalması ve diğer yandan degradasyonun artması negatif bir protein yapım/yıkım dengesini beraberinde getirir.

Miyostatin geninden yoksun farelerin; gastroknemius/plantaris, soleus ve kuadriseps kas kitlesinde gözlenen 2-3 kat artışın, lif sayısının artması ve lif çapının büyümesinden kaynaklanması miyostatinin kas gelişiminde negatif bir regülatör olduğunun göstergesidir (122). Diğer yandan saflaştırılmış miyostatin ile inkübe edilen hücrelerde ubikütin proteozom sistemin aktivasyonu ile sarkomerik protein degradasyonunda artış saptanmış ve protein kaybına yol açan mekanizma, miyostatinin FoxO1 ve atrogen-1/MAFbx ekspresyonunu Smad3 üzerinden tetiklemesi olarak açıklanmıştır (111).

2.2. Kas Atrofisi ve Moleküler Mekanizmaları

Kas lifinde küçülmeye bağlı olarak gelişen kas atrofisi; kas kesit alanında daralma, hücre organelleri, sitoplazma ve protein içeriğinin azalması ile kas lifinde güç kaybını beraberinde getirir (50). İskelet kasında atrofi, kasa etki etken yükün ve nöral aktivitenin azalması, inaktivite, yaşlanma, yetersiz beslenme, inflamatuvar sitokinlerin ve glukokortikoidlerin artması gibi streslere yanıt olarak oluşmaktadır (16). İnsan vücudundaki en büyük protein deposu olan

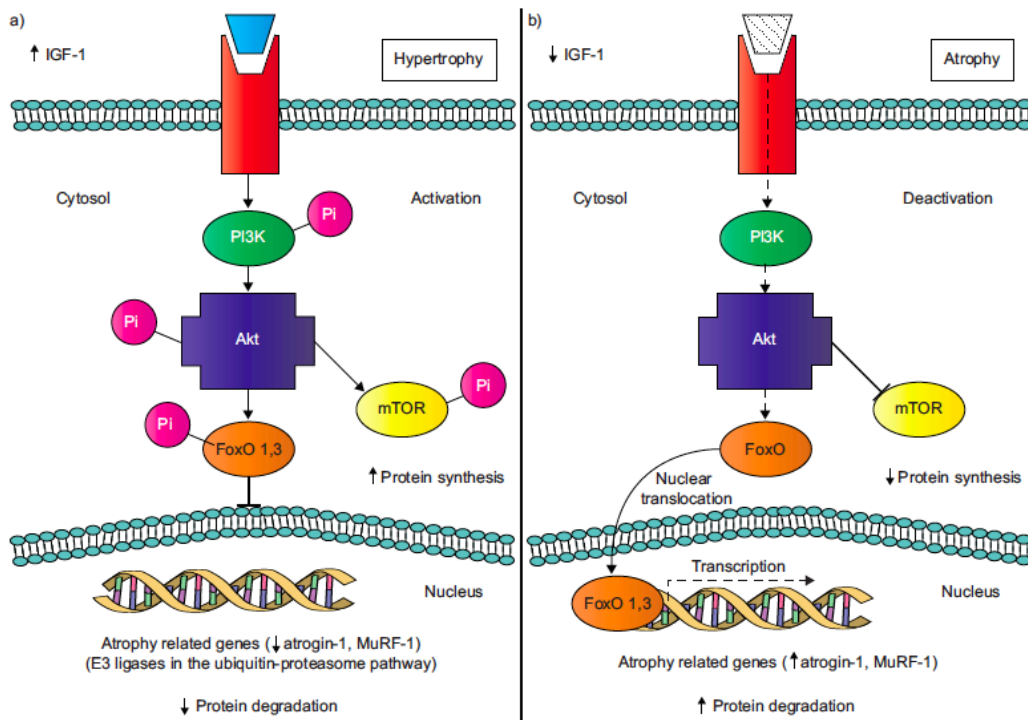
iskelet kaslarındaki aşırı protein yıkımı kas kuvveti ve dayanıklılığında azalmaya (36) neden olarak yaşam kalitesini azaltmakta, hastalıklar sonrası toparlanma sürecini uzatmakta, morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır (176). Yaşamın erken dönemlerinde lokomotor disfonksiyon gösteren nematodlarda, yaşam süresinin daha kısa olduğu belirtilmiştir (78).

İskelet kasına etki eden mekanik yükün ortadan kalkması ve nöral aktivitenin azalması 'kullanmama' olarak ifade edilir. İnaktivite (202), tedavi sonrası uzun süreli yatak istirahati (85), denervasyon ve immobilizasyon (113) iskelet kasında kullanmamaya bağlı atrofiye neden olan durumlardır. Kullanmamaya bağlı kas atrofisinin mimik edildiği alçılama ve kuyruktan asma gibi yüksüzleştirme modellerinin insan (33, 67, 146) ve hayvan (87) iskelet kas protein sentezini negatif yönde etkilediği ve kas kitlesinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Örneğin, 7 gün süresince uygulanan alçılamanın sıçan soleus kasında atrofiye neden olduğu ve genç sıçanların kas kitlesi kaybına yaşlılara göre daha yatkın olduğu bildirilmiştir (88). Kuyruktan asma modelinin sıçanlara 3 hafta süresince uygulandığı Bederman ve diğerlerinin çalışmasında (2015), negatif protein dengesi ve soleus kas kitlesinde 3 hafta sonunda %52'lik bir azalma belirlenmiştir (14). Caron ve diğerlerinin (2009) fare ayak bileğinde tek taraflı olarak dorsotibial immobilizasyon yaptıkları deneysel modelde, iki hafta sonunda tibialis anterior kasında oluşturdukları atrofide kasa özgü lizozomal ve proteozomal yolakların uyarıldığı bildirilmiştir. Bu tip kas kaybında protein sentezinde ana regülatör olan mTOR sinyali inhibisyonu da kas protein degradasyonunda rol oynamaktadır (33).

Birçok fizyolojik ve patolojik durumda meydana gelen kas atrofisinin altında yatan moleküler mekanizmalar önemli bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Güncel bilgilere dayanarak kas atrofisinde, ubikütin-proteozom sistem ve otofaji-lizozom yolak aktivitesindeki artışın rol aldığı düşünülmektedir. Ubikütin-proteozom sistem ve lizozomal yolak birbirlerini farklı düzeylerde kontrol ettikleri gibi, farklı yolaklardaki bazı noktalarda koordineli bir şekilde çalışarak protein yapım/yıkım dengesi düzenler.

2.2.1. Atrofi Sürecinde Ubikütin-proteozom Sistem ve Lizozomal Yolak

Hücrede proteolitik sistemin aktivasyonu, birçok genin transkripsiyonundaki artış ve azalma ile düzenlenir. Genel olarak bu genler, miyofibriler proteinlerin degradasyonundan sorumlu olduğu düşünülen atrofi ile ilgili genler ya da 'atrojenler' olarak adlandırılır (164, 170). Normal koşullarda protein sentezini tetikleyen ve IGF-1 yolağında görev alan Akt, bir taraftan da FoxO transkripsiyon faktörleri üzerinden ubikütin-proteozom sistem ve otofaji-lizozom yolağının fonksiyonunu da düzenler (168). Bu düzenleme FoxO ailesi üyelerinden FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 isoformlarının her üçünün de Akt tarafından fosforile edilerek sitoplazmadan çekirdeğe geçişinin engellenmesi ile gerçekleştirir (Şekil 2.2). Bu nedenle Akt sadece protein sentezi için değil, aynı zamanda ubikütin-proteozom sistem ve otofaji-lizozom yolağı açısından da kritik bir öneme sahiptir (159).



Şekil 2.2. FoxO transkripsiyon faktörlerinin Akt tarafından düzenlenmesi (97).

Gerçekten de, birçok atrofi modelinde Akt aktivitesindeki azalmaya sitoplazmada fosforile FoxO seviyelerindeki azalma ve nükleer FoxO'daki artış eşlik etmiştir (30). Kuyruktan asma yöntemi ile uygulanan yüksüzleştirme modelinin sıçan iskelet kasında Akt fosforilasyonu, mTOR aktivasyonu ve protein ekspresyonunda azalmaya neden olması (18), Akt'nin iskelet kasına etki eden yükün yokluğuna doğrudan yanıt verdiğinin bir göstergesidir.

FoxO transkripsiyon faktörlerinin translokasyonu ve transkripsiyonel aktivitesi ubikütin-proteozom sistem ve otofaji-lizozom yolağında görev alan birçok genin transkripsiyonu için önemlidir. Keza Sandri ve diğerleri (2004), besin kısıtlamasının hücre kültüründe miyotüp atrofisine neden olduğu ve buna bağlı olarak azalan PI3K/Akt aktivitesinin FoxO transkripsiyon faktörleri ve atrogin-1 indüksiyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada IGF-1'in atrogin-1 ekspresyonuna etkisini Akt üzerinden gösterdiğini belirlemek amacı ile deksametazon yoluyla atrofi oluşturulmuş ve kültür ortamına eklenen IGF-1 ya da adenoviral vektör kullanılarak Akt indüklenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hücrede artmış IGF-1 ve aktif olan Akt'nin FoxO1 ve 3 fosforilasyonunu arttırarak deksametazonun tetiklediği atrogin-1 ekspresyonunu önlediği gösterilmiştir (170). Benzer şekilde Kamei ve diğerleri (2004), kasa özgü FoxO1 aşırı ekspresyonuna sahip transgenik farelerde artan protein degradasyonunun kas kitlesinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (83). Bütün bu bulgular, kas atrofisinin spesifik sinyal yolları ve genler tarafından kontrol edilen aktif bir süreç olduğu göstermektedir. FoxO transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenen kasa spesifik ubikütin ligazlardan atrogin-1/MAFbx ve MuRF1 ekspresyonlarının, farklı atrofi modellerinde ubikütin-proteozom sistem üzerinden protein degradasyonunu gerçekleştirmek üzere arttığı bilinmektedir (105). Bodine ve diğerleri (2001), immobilizasyon ve denervasyon ile oluşan kullanmamaya bağlı atrofi modellerinin iskelet kasında MuRF1 ve atrogin-1/MAFbx ekspresyonlarını arttırdığını göstermiştir (18).

Atrofi sürecinde aktif olan MuRF1 ve atrogin-1/MAFbx (69, 41), hücrede büyüme ile ilişkili süreçler ya da hayati önem taşıyan yollardaki molekülleri hedef alırlar. Örneğin, atrogin-1/MAFbx için şu ana kadar az sayıda substrat

tanımlanabilmişse de, protein sentezinde önemli bir aktivatör olan eIF3-f (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F*) (46) ve önemli bir kas transkripsiyon faktörü olan MyoD (185) atrogen-1/MAFbx'in hedefidir. MuRF1 ise; aktin, miyozin ağır zinciri ve miyozin hafif zinciri 1, 2 (152, 41) gibi kas fonksiyonları için son derece önemli olan miyofibriler proteinlerin degradasyonuna neden olmaktadır. Gerçekten de, farelerde besin kısıtlamasından kaynaklanan kas atrofisi atrogen-1/MAFbx gen ekspresyonunun inhibisyonu ile engellenmiştir (45). Diğer yandan Baehr ve diğerleri (2011) farelerde MuRF1 gen inhibisyonunun deksametazon kaynaklı kas atrofisini engellediğini, ancak aynı koşullara atrogen-1/MAFbx gen inhibisyonunun yanıt vermediğini göstermiştir (8). Bir başka çalışmada ise farelerin atrogen-1/MAFbx ve MuRF1 genlerinden yoksun olmasının, immobilizasyonun neden olduğu kas atrofisine direnci arttırdığı gösterilmiştir (17). Bu çalışmalar iskelet kasına spesifik ubiquitin ligazlar olan atrogen-1/MAFbx ve MuRF1'in atrofiye yol açan uygulamaların bir kısmına birlikte bir kısmına ise ayrı yanıt verdiklerini göstermektedir.

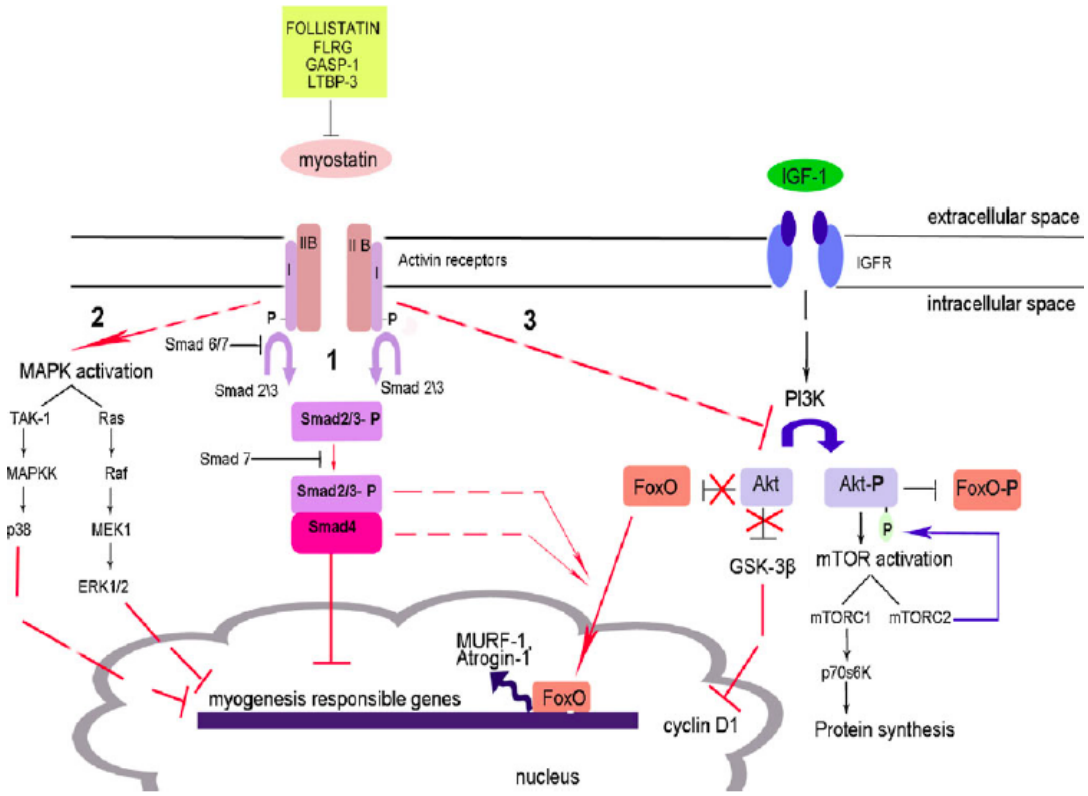
2.2.2. Atrofi Sürecinde Miyostatin Yolağı

Dönüştürücü büyüme faktörlerinden miyostatin, büyüme ve gelişim ile ilgili olan IGF-1 yolağı ile etkileşerek miyofibriler proteinlerin sentezinin baskılanması ve miyogenezin inhibisyonundan sorumludur. Miyostatin geninden yoksun farelerde gelişim süresince kas lif sayısında ve kitlesinde artış meydana geldiği bilinmektedir (122, 123). Miyostatinin sürekli inaktif kalmasına neden olan *mstn* genindeki doğal mutasyonlar, iskelet kasında hipertrofiye neden olmaktadır (82). Zhou ve diğerleri (2010) farelerde oluşturdukları kanser kaşeksi modelinde, çözünür formda ActRIIB verilmesi ile gastroknemius kasında ubiquitünlene protein miktarının azaldığı, kas kitlesinin korunduğu, kas kuvvetinin geri kazanıldığı ve yaşam süresinin arttığı sonuçlarını elde etmişlerdir (206).

İmmobilizasyona bağlı kas atrofisi ile ilgili birçok durumda miyostatin ekspresyonunun insanda ve hayvanda arttığı bilinmektedir. Örneğin, ortopedik ameliyat öncesi yatak istirahati alan hastaların iskelet kaslarında miyostatin

ekspresyonu artmıştır (158). Kuyruktan asma modeli ile 10 gün süresince uygulanan immobilizasyonun, plantaris kasında miyostatin gen ekspresyonunu %110, miyostatin protein ekspresyonunu %37 arttırdığı ve kas kitlesinde %16 azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (194). Benzer şekilde, 17 gün süresince mikrogravite yolu ile uygulanan immobilizasyon sıçan kasında miyostatin ekspresyonunu arttırmıştır (99).

Geçmişte miyostatinin kas gelişimini miyofibriler protein degradasyonunu etkileyerek mi yoksa miyogenezini engelleyerek mi düzenlediği konusunda net bilgilere sahip değilken, son on beş yılda yapılan çalışmalar miyostatinin IGF1-PI3K-Akt-mTOR yolağıyla olan ilişkisini ortaya koymuştur. Song ve diğerlerinin (2006) IGF-1'in Smad3'ü PI3K/Akt yolağı üzerinden inhibe ettiğini göstermelerinden sonra (177), Trendelenburg ve diğerleri (2009) miyostatinin Akt aktivasyonunu inhibe ettiği ve IGF-1'in miyostatinin hücre farklılaşmasını engelleyen etkisini azaltmada etkili olduğu sonucunu elde etmişlerdir (188). Bununla birlikte, farelere 4 gün süresince miyostatin antikorunun enjekte edilmesi miyofibriler protein sentezinin aktivasyonundan sorumlu sinyal moleküllerinden olan p70S6K fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (197). Miyostatin inhibisyonunun mTOR tarafından fosforile edilen p70S6K aktivasyonunu arttırması, miyostatinin miyofibriler protein sentez hızı üzerine de etki gösterdiğini açıklamaktadır. Tüm bu bulgular, protein sentez/yıkım dengesinin IGF-1, Akt, mTOR, miyostatin, Smad3 sinyal molekülleri tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Miyostatin yolağının IGF-1 yolağı ile ilişkisi Şekil 2.3'de gösterilmiştir (58).



Şekil 2.3. Miyostatin yolağının IGF-1 yolağı ile ilişkisi (58).

Kas kitlesindeki kayıplar fiziksel inaktivite ile oluşmakta ve organizmayı olumsuz yönde etkilemektedir. Kas kitlesinin sadece %5'ini kaybetmek bile immün sistemin baskılanmasına neden olurken (90), kişinin sağlık durumu (10) ve yaşı (124) gibi faktörlerin varlığı sorunun ciddiyetini arttırmaktadır. Ektremitelerde meydana gelen kemik kırıkları, spor yaralanmaları ya da cerrahi girişimler, belirli bir süre tedavi amaçlı uygulanan immobilizasyonu zorunlu kılar (25). Hızlı bir kas atrofisinin gözleendiği immobilizasyon sonrası kas kitle ve kuvvetini yeniden kazanmaya yönelik yapılan bilimsel araştırmalar, hastalık ya da sakatlık sonrası toparlanma sürecine daha özenle yaklaşılması gerektiği konusuna dikkat çekmektedir (16). Özellikle spor yaralanmalarında, sporcunun bir an önce eski formunu kazanması, düzenli ve istenilen şiddette antrenmanlarına başlayabilmesi spor hekimliğinin en önemli sorunlarından.

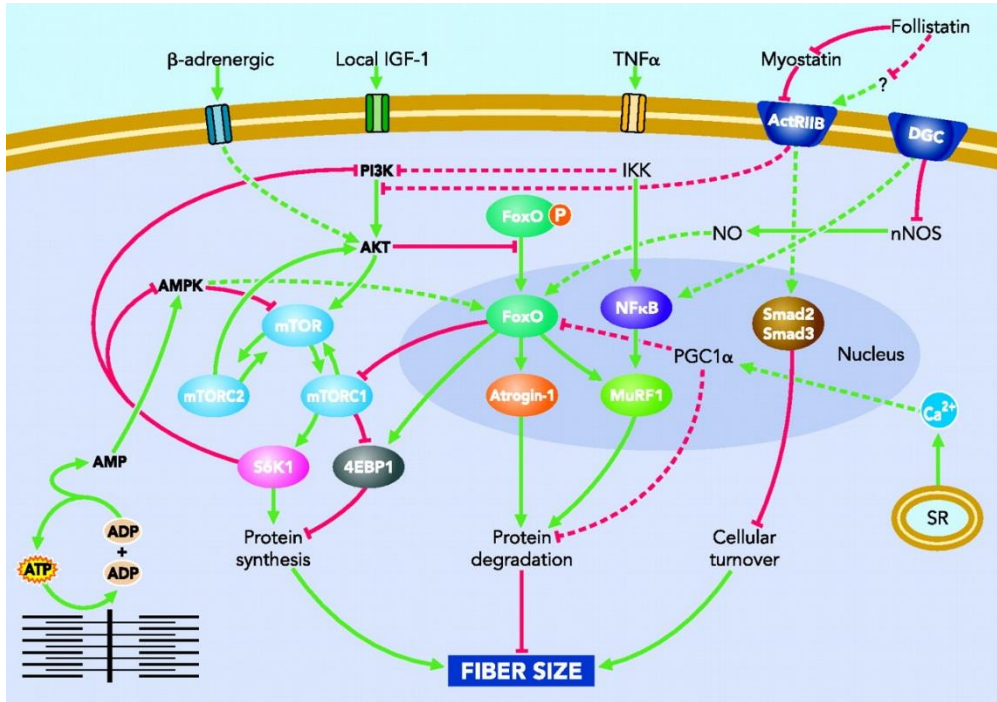
2.3. AMPK ve İskelet Kası Atrofisindeki Olası Rolü

AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), hücre içerisinde enerjiyi algılayan ve buna ilişkin sinyal oluşturan bir proteindir. Kas hücresi içerisinde AMP/ATP oranı, bir metabolik stres belirtisi olan AMPK aktivasyonuna yol açar (154, 167). Enerji düzeyini algılayan bir molekül olarak AMPK aktivasyonu ATP'yi kullanan yolları inhibe ederek enerjinin korunması, yerine konması ve sürdürülebilmesi yönünde rol oynar (75). Böylece ATP gerektiren anabolik süreçlerin inhibisyonu sağlanmış olacaktır. Bununla ilişkili olarak AMPK, TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2)'yi fosforile ederek aktivasyonunu sağlar. TSC2, mTOR ve p70S6K'yi inhibe eder.

Diğer yandan AMPK'nin FoxO3'ü Akt1 den bağımsız olarak çeşitli noktalarda fosforile ettiği ve FoxO3'ün transkripsiyonel aktivasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (70, 71). Bolster ve diğerleri (2006), AMPK aktivasyonunu kimyasal yolla arttırmak için 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-d-ribose nucleoside (AICAR) enjekte ettikleri erkek sıçanlarda özellikle alpha2 AMPK aktivitesinin kasta %51 oranında arttığı ve AICAR enjeksiyonun protein sentezini %45 oranında azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada protein sentezindeki azalmaya mTOR, p70S6K ve eIF4G fosforilasyonunda azalmanın da eşlik ettiği belirtilmiştir (21). Akut olarak dinlenme boyunun ötesinde uzatılmış olan kasta elektrik uyarısının neden olduğu 4E-BP1 ve p70S6K1 fosforilasyonundaki artışı AICAR yoluyla AMPK'nin aktivasyonunun baskıladığı bildirilmiştir (184). Diğer yandan, Nakashima ve Yakabe (2007) kas kültürünü AICAR eklenmesiyle FoxO üzerinden atrogen-1 ekspresyonu ve protein yıkımının arttığını göstermişlerdir (131). Miyofibriler AMPK, enerji stresinde (yetersiz enerji) FoxO3'ü aktive ederek atrogen-1 and MuRF1 ekspresyonunu arttırmaktadır (163). Ayrıca, AMPK aktivasyonunun LC3 ve Bnip3 gibi otofaji ile ilişkili genleri indüklediği bildirilmiştir. Böylece FoxO3'ün otofaji ve protein yıkımında rol oynadığı ileri sürülmüştür (163).

Thomson ve diğerleri (2008), genç ve yaşlı sıçanlarda gastrocnemius kasında tek taraflı tenotomi yolu ile sinerjist kaslar olan soleus ve plantaris etki eden yükü arttırmayı hedefledikleri çalışmada, yaşlıda artmış fosforile AMPK düzeylerinin yükün arttırıldığı plantaris kasındaki hipertrofiyi azalttığını

gözlemişlerdir (184). Krawiec ve diğerleri (2007), iskelet kası hücresi olan C2C12 hücrelerini farklı dozlardaki AICAR veya bir diğer AMPK aktivatörü olan metformin ile 24 saat inkübe ettiklerinde MAFbx ve MuRF1 mRNA'larının doza bağlı olarak arttığını gözlemişlerdir. AMPK inhibitörünün kültüre eklenmesi ise, MAFbx ve MuRF1 mRNA'larındaki artışı engellemiştir. Böylece araştırmacılar AMPK'nin iskelet kas atrofisinde görev alan sinyal yolları üzerinden etkin olduğunu göstermişlerdir (94). Şekil 2.4'de AMPK aktivasyonunun mTOR'un inhibisyonunda ve iskelet kası spesifik ubikülin ligazlar olan atrogin/MAFbx ve MuRF1'i FoxO üzerinden aktive ettiği görülmektedir.



Şekil 2.4. Kas hücresinde de protein sentezi ve degradasyonlarına yol açan ana yollar (169).

Sonuç olarak AMPK fosforillenmesi bir yandan mTOR üzerinden protein sentezini inhibe ederken (21, 182), diğer yandan FoxO3 üzerinden protein degradasyonunu uyararak kas atrofisinde rol almaktadır (94, 131).

Sıçanda kuyruktan asma yoluyla oluşturulan atrofi modelinde enerji depolarının azaldığı ve protein döngüsünün yıkım yönünde değiştiği (27) göz önüne alındığında, yüksüzleştirme sırasında AMPK aktivasyonunun artacağı ve bu aktivasyonun atrofide rol oynayacağını düşünülebilir. Diğer yandan, sıçanda kuyruktan asma yoluyla oluşturulan yüksüzleştirme veya denervasyonun AMPK aktivasyonunun azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (73, 108, 148). Bu nedenle immobilizasyon ve TVT uygulamasının AMPK düzeylerini nasıl değiştireceği merak konusudur.

2.4. İmmobilizasyon Sonrası Toparlanma Sürecine İlişkin Yaklaşımlar

Kullanmamaya bağlı kas atrofisi sonrasındaki toparlanma süreci oldukça yaygın klinik bir problem olmasına karşın, kas kitlesi ve beraberindeki kuvvet kaybını önleyecek başarılı bir terapi ya da ilaç tedavisi bulunmamaktadır. Şu ana kadar sadece direnç egzersizlerinin, kas atrofisini geriye döndürme ya da kas kitlesi ve kuvvetini korunmada uygulanabilecek bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (66, 16). Gerçekten de, direnç egzersizlerinin iskelet kasında yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olduğu hayvan ve insan çalışmaları ile ortaya konmuştur. Örneğin Baar ve diğerleri (1999), sıçanlar anestezi altında iken siyatik sinirin toplam 22 dakika süresince uyarıldığı (100 Hz; 60 kasılma) bir direnç egzersizi protokolü uygulayarak kas kitlesinin, tibialis anterior (TA) kasında $14,4 \pm 3,15$ ve ekstansör digitorium longus (EDL)'de $13,9 \pm 3,01$ arttığını saptamışlardır. Bu çalışmada aynı zamanda protein sentez yanıtı da incelenmiş ve S6 protein kinaz (p70S6k) fosforilasyonunun 3 ve 6. saatler arasında TA'da $363,2 \pm 29,4$ ve EDL'de $353,4 \pm 39,5$ arttığı sonucu elde edilmiştir (7). Hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular insan çalışmaları ile paralellik göstermektedir. On iki haftalık direnç egzersizlerinin dominant olmayan kolda biceps brachii kas kesit alanında erkeklerde $14,8$, kadınlarda $12,6$ ve dinamik kuvvette erkeklerde $48,2$, kadınlarda $72,1$ 'lik artışa neden olduğu saptanmıştır (129). Apró ve diğerleri (2013) ise, orta düzeyde antrenmanlı 10 katılımcının yaptığı 45 dakikalık yüksek şiddetteki direnç egzersizi sonrasında mTOR fosforilasyonunun 2 kat ve onun etkilediği S6 kinase

1 S6K1 (S6K1) fosforilasyonun 14 kat arttığını göstermiştir (6). Direnç egzersizlerinin sadece gençlerde değil, yaşlılarda da kas kitle ve kuvvetini arttırdığı bilinmektedir. Sarkopeni olarak tanımlanan ilerleyen yaşla birlikte kas kitle ve kuvvetinde ortaya çıkan kayıpların (178) etkilerinin azaltılmasında direnç egzersizleri ile artan kas kitle ve fonksiyonunun önemli bir yeri vardır (109, 194, 151). Öte yandan uygulamaya yönelik bazı zorluklar, direnç egzersizlerini bir tedavi yöntemi olarak her zaman kullanılabilmesini sınırlamaktadır. Örneğin, kas kitlesinde artışın tetiklenmesi için direnç egzersizlerinin belirli bir şiddetin üstünde olması gerekmektedir. Ancak, özellikle yaşlı bireylerde kişinin sağlık koşulları o şiddetteki direnç egzersizlerini tolere edecek durumda olmayabilir. Bu da yapılan egzersizin hedeflenen amaca ulaşmamasına neden olur. Diğer yandan egzersiz programını takip edecek bir uzman, egzersizlerin yapılacağı uygun bir ortam, kişilerin aktivite düzeyi ve bu programın maliyeti de bir başka tartışma konusudur (66).

2.5. İskelet Kası Sıcak Şoku Proteinleri

Organizmanın strese uygun bir şekilde yanıt vermesi, homeostazisin korunması ve hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için yaşamsaldır. Bu yanıtta en önemli rolü sıcak şoku proteinleri veya stres proteinleri olarak adlandırılan HSP'ler oynar. HSP'ler canlı dünyasında evolüsyon süreci boyunca oldukça iyi korunmuş bir grup protein ailesinden oluşmakta olup kronik veya akut stres koşullarında hücre homeostazisinin korunmasında rol alır (91). Hsp'ler canlı organizmalar, dokular ve hücrelerde birbirinden farklı çok çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. HSP'lerin sitoplazmik konsantrasyonları başta sıcak stresi olmak üzere, serbest radikaller, protein denaturasyonu ve agregasyonu, hücre içi asiditenin artması, proteoliz gibi çok çeşitli streslerde artış gösterir (106, 196).

Yaşam süreci boyunca iskelet kasları büyüme ve gelişme ile yaşlanma başta olmak üzere çeşitli çok çeşitli adaptif süreçlerden geçer. Vücudun en büyük organı olarak nitelendirilen iskelet kasları bu uyum sürecini sürdürebilmesi ve diğer çeşitli streslere yanıt verebilmesi için gerek yapısal ve gerekse indüklenebilir oldukça geniş bir HSP ailesi üyelerine sahiptir. Bunlar 70 kDa

ailenin yapısal ve indüklenebilen üyeleri olan Hsp72 ve Hsp73, mitokondrial şaperon olarak rol alan Hsp60 ve Hsp75, Hsp90, Hsp47, Hsp32, Hsp25/27 ve düşük moleküler ağırlıklı HSP'ler olan Hsp20, alfa beta crystallin ve diğerleridir (92, 135). Bunların içerisinde Hsp72 ve Hsp25/27'nin (insandaki formu Hsp27) iskelet kasları için ayrı bir önemi vardır.

İskelet kasları farklı tip kas liflerinden oluşmuştur. Sıçan iskelet kasında yavaştan hızlıya doğru sırasıyla tip I, tip IIa, tip IIx ve tip IIb olmak üzere dört farklı kas lif tipi bulunmaktadır. İskelet kaslarında lif tiplerinin dağılımı kasın bulunduğu yere ve buna göre kasın fonksiyonuna bağlı olarak değişir. Örneğin yer çekimine karşı ayakta durmayı sağlayan soleus ve medial gastrocnemius ağırlıklı olarak tip I liflerinden oluşmuşken EDL kasında tip IIb yüzdesi en fazladır ve tip I neredeyse hiç bulunmaz (53). Bazal koşullarda, tip I ve tip IIa liflerinden zengin tonik olarak aktif olan soleus gibi postür kasları daha yüksek HSP içermektedir (136). Bu durumun, bazal düzeyde bu kas liflerindeki artmış aktiviteye ve oksidan strese bağlı artan transkripsiyon ve dolayısıyla bu koruyucu proteinlere olan ihtiyacın arttırması nedeniyle mi oluştuğu konusu net değildir. Bununla birlikte, kas miyozin fenotipinde değişikliğe yol açan, tiroid hormon düzeylerinin artırılması (102) veya kas hipertrofisine ilişkin çalışmalar (138) Hsp72'nin bazal düzeylerinin belirlenmesinde miyozin profilinin daha etkili olduğunu göstermektedir. Genel olarak tip I ve IIa liflerinde Hsp72 ekspresyonu bazal düzeyde de yüksek iken, tip IIx ve IIb liflerinde düşüktür (110, 102, 138, 139).

70kDa HSP ailesinin indüklenebilir üyesi olan Hsp72, protein sentezi sırasında yeni oluşan peptidlere eşlik ederek onların proteazlar tarafından parçalanmasının önlenmesinde, doğru katlanmalarında ve hücre içi lokalizasyonlarına güvenli taşınımında rol oynar (13). İmmobilizasyonu takiben yapılan remobilizasyon döneminde Hsp72 miktarlarının arttığı gösterilmiş olup, bu artışın atrofi sonrası toparlanmaya yardımcı olabileceği belirtilmiştir (190).

Egzersiz, artmış kas içi sıcaklık, metabolik düzensizlik ve olası kas hasarı ile karakterize, hücrenin çok da alışık olmadığı bir stres oluşturur (136). Egzersiz sırasında sıcaklık artışının egzersizin şiddetine bağlı olarak arttığı bilinmektedir (166, 89). Böylece egzersiz, hücrede HSP artışına neden olan hücre içi

değişiklikleri gerçekleştirerek özellikle HSP düzeylerinde artışa yol açar (54, 130, 140, 137). Egzersizin yol açtığı bu HSP artışı, egzersiz tipi, şiddeti, sıklığı ve süresi (54, 53) gibi faktörler yanı sıra daha önceki antrenman durumu gibi faktörlerden etkilenir (126). Hsp72 ve Hsp27'nin insanda ekzentrik (147) veya izometrik egzersizler (189) sonrasında artış gösterdiği belirtilmiştir.

Kasın yüksüzleştirilmesi genel olarak HSP düzeylerinde bir düşüşe yol açarken, sinerjist kasın tenatomisi yoluyla gerçekleştirilen yükün arttırılması koşullarında HSP seviyelerinde artış görülür. İki haftalık immobilizasyon Hsp72 ve Hsp60 düzeylerinde önemli ölçüde düşüşe yol açtığı (141) ve Hsp25 fosforilasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Diğer yandan plantaris kasında yükün arttırılması, lif tipinin yavaş tip yönünde değişimi ile birlikte bazal düzeyde Hsp72 düzeylerinde artışa neden olmuştur (110).

Hsp72 ve Hsp25 iskelet kasında hücreyi koruyucu özelliğe sahip stres proteinlerindedir. İskelet kasının elektrik stimülasyonu yolu ile kontraksiyonunun kasın uyarılma sırasındaki boyuna göre değiştiği görülmektedir. Dinlenim boyundan daha uzun pozisyonda tutularak yapılan elektrik stimülasyonunda daha kısa pozisyonda tutularak yapılan elektrik stimülasyonuna göre takip eden 8. saatten 7. güne kadar kas hasarı sergilediği ve bu hasara Hsp72 ve Hsp25'in eşlik ettiği görülmüştür. Diğer yandan Inoue ve diğerleri (2009), dört haftalık alçı yoluyla immobilizasyonun ardından bir hafta remobilizasyon ve pasif germenin soleus Hsp72 ve Hsp25 düzeylerin etkisini inceledikleri çalışmada pasif germenin kas hasarını azaltmasına karşın remobilizasyona göre daha az HSP proteinlerine sahip olduğunu belirtmiştir (81). Bu çalışmalar hasarın varlığı durumunda Hsp25 ve Hsp72 indüklenmesinin daha yüksek düzeyde kaldığını göstermektedir.

Sekiz günlük kuyruktan asma yoluyla gerçekleştirilen atrofi modelinde, 24 saat öncesinde sıcak stresi yoluyla Hsp72 indüklenmesi kas atrofisini %32 oranında azaltmaktadır (130). Benzer şekilde Duchenne kas distrofisinde (DMD) BGP-15 isimli farmakolojik Hsp72 indükleyicisi aracılığıyla intramüsküler Hsp72 düzeylerinin arttırılmasının; farelerde oluşturulan iki farklı DMD modelinde sarkoplazmik retikülüm Ca^{+2} ATPaz'ın fonksiyonunun korunmasını sağlayarak distrofik patolojiyi azalttığı, kas kuvvetini koruduğu, kontraktil fonksiyonlarını

iyileştirdiği ve ekstremitelerde kaslarında görülen distrofik patolojiyi gerileterek fare ömrünü uzattığı görülmüştür (63).

Bu çalışmalar, iskelet kası atrofisinde azalması beklenen Hsp düzeylerinin arttırılmasının remobilizasyonda karşımıza çıkan fonksiyon kaybının azaltılmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

2.6. Tüm Vücut Titreşimi

Son yıllarda tüm vücut titreşimi (TVT)'nin nöromusküler adaptasyonlar yolu ile kasın ürettiği güç ve dayanıklılıkta artış meydana getirerek direnç egzersizlerine benzer bir etki gösterdiği bildirilmiştir (115, 19). TVT ile kuvvet kazanımının temel olarak kas kontraksiyonunu başlatan gerim refleksi duyarlılığının artışına bağlı nöral faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (62, 145). Yatay bir platformun vertikal düzlemde düşük genlik ve yüksek frekansta titreşimler üretmesi ile uygulanan TVT, alfa motor nöronları uyararak kas kasılmasını başlatır (35). Genel olarak insanda 20-40Hz frekans ve 1-5mm genlik, sıçanda ise 17-90Hz ve 0,1-3mm olarak uygulanan protokollerin kas kasılmasını uyaran nitelikte olduğu belirtilmiştir (116, 157). Antrenmansız genç yetişkinlerde haftada 3 defa olmak üzere 12 hafta süresince TVT üzerinde uygulanan statik ve dinamik diz ekstansör egzersizlerinin, izometrik diz ekstansör torkunda $16,6 \pm 10,8$ ve dinamik kuvvette $9,0 \pm 3,2$ artışa neden olduğu bildirilmiştir (51). Aynı çalışmada TVT uygulanan grup ile aynı zaman dilimi içerisinde direnç egzersizleri yapan grup (RES) ve TVT'nin plasebo etkisinin test edildiği bir diğer grup oluşturulmuştur. İzometrik diz ekstansör torku ve dinamik kuvvette TVT grubunda olduğu gibi RES grubunda da artış gözlenmiş ancak, plasebo grubunda herhangi bir değişiklik olmamıştır. Diğer yandan, sıçrama yüksekliğinde ($7,6 \pm 4,3$) patlayıcı güçteki gelişime bağlı olarak sadece TVT grubunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu bulgular, kronik TVT uygulamasının iskelet kas kuvvetinde gelişime neden olduğunu ve bunun bir plasebo etkisi olarak yorumlanamayacağını göstermiştir. Benzer şekilde 50Hz frekans ve 4mm genlikte, 60sn titreşim ve 60sn dinlenmeden oluşan TVT seansını haftada haftada 2 gün bile yapmanın yağsız kas kitlesinde ve izokinetik kuvvette, 60, 180 ve 270 derecelerde artışa yol açtığı ve haftada 3 gün yapanlarda bu

etkinin daha fazla görüldüğü ifade edilmiştir. Böylece, bu vibrasyon modalitesinin genç sporcularda kas kitle ve kuvvetini geliştirmekte kullanılabileceği ileri sürülmüştür (119). Wilcoock ve diğerleri (2009), antrene sporcularda yapılmış olan altı çalışmadan yola çıkarak vibrasyonun genel olarak kas üzerine etki eden g-kuvvetini artırdığı ve yapılan egzersiz yükü üzerine ilave bir yük sağladığı ve bu yükün kas hipertrofisine yardımcı olduğunu belirtmiştir (199). Her ne kadar Wilcoock'un sözünü ettiği vibrasyon kassal antrenman sırasında uygulanan vibrasyon olsa da, nöromüsküler potansiyelin artışı açısından TVT uygulaması ile benzerlik göstermektedir. Çalışmalar TVT'nin EMG aktivasyonunda artışa yol açtığını göstermiştir (31, 47). TVT'nin akut etkisi tonik vibrasyon refleksi adı verilen kassal refleks ortaya çıkarmasıdır (118). Vibrasyonun esas olarak kas içciklerinden gelen afferent uyarıların gerime daha duyarlı hale gelmesine neden olduğu, böylece alfa motor nöron aktivasyonunu ve dolayısıyla motor ünite katılımını, ateşleme frekansını ve motor üniteler arasındaki uyumu arttırdığı bildirilmiş ve bunların sonucu olarak daha güçlü bir kas kasılmasının ortaya çıktığı ifade edilmiştir (199).

TVT uygulamasının yaşlı kadın ve erkeklerde kas hipertrofisine de yol açtığı gösterilmiştir (112). Bu nedenle, yeterli şiddette direnç egzersizi yapmanın risk oluşturduğu durumlar ve yaşlılıkta TVT'nin kas kitle ve fonksiyonun korunması için uygun bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan, TVT'nin iskelet kasında kitle artışına neden olan sinyal yolları üzerine etkisi bilinmemektedir. *In vitro* olarak mürin hücre kültüründe ve *in vivo* olarak altı günlük CD1 fare kasından elde edilen uydu hücrelerde ve CD1 farelerin 30Hz frekansta vibrasyona tabi tutulduktan sonra hipertrofi ve atrofi sinyal yollarının incelendiği çalışmada mekanik vibrasyonun CD1 fare kasında atrofi genlerini ve miyostatini güçlü bir şekilde down-regüle ettiği ve uydu hücrelerin füzyonunu sağladığı saptanmıştır. Diğer yandan mürin hücre kültüründe yapılan proliferasyon çalışmasında uyarılan hücrelerin büyüme hızının azaldığı görülmüştür (34). TVT'nin iskelet kas atrofisinde rol oynayan sinyal yolları üzerine etkisinin aydınlatılması, özellikle alçı, atel veya ameliyat gibi atrofiye neden olan koşullarda ve belki de sarkopeni gibi yaşa bağlı kas kitle ve kuvvet

kaybında tedavi ve rehabilitasyon modalitelerinin belirlenmesi açısından da önem taşımaktadır.

Diğer yandan, TVT sırasında vibrasyonun mekanik enerjisinin doku ve çeşitli kompartmanlardaki vücut sıvıları tarafından absorbe edildiğini (191) ve bunun da, sıcaklık artışına neden olduğu bildirilmiştir (39, 40). On beş dakika süreli 100Hz frekanslı lokal vibrasyon uygulamasını takiben ön kolda deri sıcaklığının arttığı ve 10dk boyunca yüksek kaldığı, ayrıca deride eritem oluşturduğu bildirilmiştir (144). Keza 16dk 45Hz frekansında, 2mm genlikte aralıklı vibrasyon uygulamasının uyluk deri sıcaklığını arttırdığı, bunun kas lif uzunluğunda değişikliğe yol açan refleks kasılmaya bağlı kas içi sıcaklığı artışı ve ısıyı uzaklaştırmak için deri kan akımı artırışından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (77).

İskelet kası kullanmamaya atrofi ile yanıt verir. Bu süreçte proteoliz hızı protein sentez hızının ötesine geçerek kas kaybına neden olur. Bir diğer ifade ile protein yıkımı artarken sentezin azalması protein kaybı ve atrofiye neden olur. Yıkım veya sentez hızının azalmasının atrofi oluşumuna relatif katkılarının doğrudan ölçüldüğü bir çalışma yoktur. Bununla birlikte kullanmamanın protein degradasyonunu uyardığı ve bu sürecin çeşitli proteolitik mekanizmaların ortaklaşa etkisi ile sağlandığı düşünülmektedir.

Gerçekten de, bilinen bütün kullanmama atrofilerinde ubiquitin-proteozom yolağı ana yolaktır (16). Kullanmamaya bağlı atrofide bu yolağın kilit roldeki genlerinin aktivasyonunu ile kasa spesifik E3 ligazlar olan MAFbx/atrogen1 ve MuRF1 mRNA'ların miktarı yükselir (17) ve 20S ve 26S proteozom kompleksinin proteolitik aktivitesi artar.

Kullanmama atrofisi sırasında kas proteazları ve otofaji de aktive olur. Kalsiyum bağımlı proteaz olan Calpain mRNA ve aktivasyonunun mekanik yüksüzleştirme koşullarında arttığı iyi bilinmektedir (180, 5, 181). Özellikle kaspaz-3, -6, -8 ve 12 yüksüzleştirme ile aktive olan diğer önemli proteazlardır (5, 181). Gerek insan ve gerekse kemirgen çalışmaları, kullanmama sırasında lizozomal sistem üzerinden otofajinin de arttığını bildirmektedir (80, 5, 181, 29). Bu çalışmada iki haftalık alçılama yoluyla oluşan immobilizasyonun atrofi sinyal yolağında görev alan bazı anahtar moleküller üzerine etkisi, TVT'nin protein

sentezine ilişkin sinyal yolaklarını aktive edip etmediği ve son olarak da TVT'nin immobilizasyonu takip eden bir haftalık remobilizasyon döneminde protein sentez ve degradasyon sinyal yolaklarına etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle atrofi oluşum mekanizması, bir diğer ifade ile kas proteazları veya otofajinin bu moleküllerin aktive veya inaktive oluşundaki rolü değerlendirilmemiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Grubu

Bu çalışmada, daha önce 'İMMOBİLİZASYON VE TİTREŞİM UYGULAMASININ AŞİL TENDONU ÜZERİNE ETKİSİ' başlıklı uzmanlık tezi için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2010-42 sayılı etik kurul onayı verilmiş hayvanlardan izole edilip saklanmış kas dokuları kullanılmış olup, ikinci bir etik kurul iznine gerek olmadığı konusunda Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından bilgilendirme yapılmıştır.

Vücut ağırlıkları 200-250gr olan 30 adet 4-6 aylık dişi Wistar Albino cins sıçan, bir hafta süreyle 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda, her kafeste bir hayvan olacak şekilde, yaklaşık 22°C oda ısı ve % 50-60 nem içeren ortamda barındırılarak buldukları ortama adapte olmaları sağlanmıştır. Hayvanlara, günlük beslenme gereksinimlerini aynı oranlarda karşılamaları için eşit miktarlarda yem ve su verilmiştir. Bir haftalık adaptasyon sürecinden sonra hayvanlar, immobilizasyon ve TVT uygulamalarına başlamak üzere aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır.

3.1.1. Deney grupları

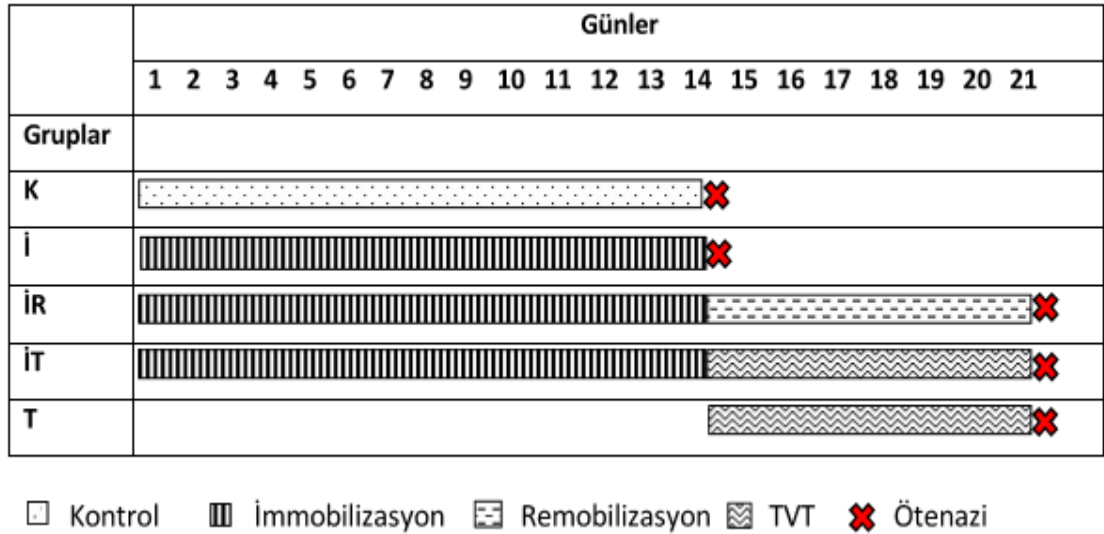
- 1- Kontrol grubu (K; n=6):** Bu grup hayvanlar hiçbir uygulama yapılmaksızın diğer gruplarla özdeş içerikli yiyecekler ile beslenmişler ve 12 saat aydınlık/karanlık periyoduna tabi tutulmuşlardır. Hayvanlara iki hafta sonunda ötenazi yapılarak soleus kasları izole edilmiştir.
- 2- İmmobilizasyon (İ; n=6):** İmmobilizasyonun iskelet kasında atrofiye neden olan sinyal yolları üzerine etkisinin gözlenmesi için bu gruptaki hayvanlara iki hafta süren alçılama uygulanmıştır. Hayvanlara iki hafta sonunda ötenazi yapılmış ve soleus kasları izole edilmiştir.
- 3- İmmobilizasyon-Remobilizasyon (İR; n=6):** Bu grup hayvanlar iki haftalık immobilizasyon uygulaması sonrasında bir hafta süresince hiçbir uygulama yapılmaksızın normal koşullarda barındırılmışlardır. Bir haftanın sonunda hayvanlara, İT grubu ile eş zamanlı ötenazi yapılmış ve

soleus kasları izole edilmiştir. Böylece TVT'nin immobilizasyon sonrasında oluşan atrofi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4- İmmobilizasyon-Titreşim (İT; n=6): Titreşimin, immobilizasyon sonrası kas atrofisinde rol alan bazı sinyal yolları üzerine etkisini incelemek amacıyla hayvanlara iki haftalık alçılmayı takiben bir hafta süreyle TVT uygulanmıştır. TVT protokolünün sonunda hayvanlara ötenazi yapılmış ve soleus kasları izole edilmiştir.

5- Tüm Vücut Titreşimi (T; n=6): Bu grup TVT'nin tek başına iskelet kasında protein sentezi ile ilgili sinyal yollarındaki bazı genler üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile oluşturulmuştur. Hayvanlar, diğer gruplara uygulanan iki haftalık immobilizasyon süresince normal koşullarda barındırılmıştır. İki hafta sonunda bu grup İT grubu ile eş zamanlı TVT uygulamasına alınmıştır. TVT uygulaması sonrasında hayvanlara ötenazi yapılmış ve soleus kasları izole edilmiştir.

Şekil 3.1. Deneysel Planlama.



3.2. DENEY PROTOKOLLERİ

3.2.1. İmmobilizasyon

Bu çalışmada, iskelet kasında atrofiye neden olduğu bilinen bir immobilizasyon yöntemi olarak alçılama kullanılmıştır. Alçılama işleminden önce hayvanlar 90mg/kg Ketamin (Ketalar 50mg/ml ketamin hidroklorür + benzetonyum klorür, Pfizer) ve 10mg ksilazin (Rompun %2 çözelti 23,32mg/ml ksilazin hidroklorür, Bayer)'in intraperitonel enjeksiyonu ile uyutulmuştur. Soleus kasının da içerisinde olduğu plantar fleksörlerde en fazla atrofiye neden olan alçılama pozisyonu ayak bileğinin plantar fleksiyonda iken alçıldığı pozisyon olduğu bilinmektedir (93, 87). Bu nedenle alçılama her iki bacak plantar fleksiyonda iken, hayvanların hareket kısıtlamasını en iyi düzeyde sağlamak amacı ile iliak kanatların üzerinden alt ekstremiteleri tamamen içerisine alacak şekilde yapılmış ve gluteal bölge açıkta bırakılmıştır (Şekil 3.2). Alçılama yapılan hayvanlar iki hafta süre ile kafeslerinde beslenme gereksinimlerini karşılayabilecek şekilde barındırılmıştır.

3.2.2. Tüm Vücut Titreşimi

TVT uygulaması, hayvanların bir hafta süre ile her gün aynı saatte 45 Hz frekans ve 3 mm genlikte titreşim veren bir platform üzerinde tutulması ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). TVT uygulaması toplam süre içerisinde 2 dakika titreşim ve 1 dakika dinlenme periyotları şeklindedir. Hayvanların titreşim platformuna adaptasyonlarının sağlanması amacı ile 15 dakika ile başlanmış, bu süre her gün 5'er dakika arttırılıp 4, 5, 6 ve 7. günlerde 30 dakika olacak şekilde uygulanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. TVT Uygulama Planı.

Günler	Frekans (Hz)	Genlik (mm)	Toplam Süre (dk)
1	45	3	15
2	45	3	20
3	45	3	25
4	45	3	30
5	45	3	30
6	45	3	30
7	45	3	30

**Şekil 3.2.** Alçı uygulaması.**Şekil 3.3.** TVT uygulaması.

3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.3.1. Doku İzolasyonu

Dokular, deney protokollerinin İR, İT ve T grubu için 21. günde tamamlanmasını takip eden 24 saat içerisinde, K ve İ grubu için 14. Günün tamamlanmasının hemen ardından alınmıştır. Hayvanlar intraperitoneal pentobarbital sodyum (100mg/kg) enjeksiyonu ile derin anestezi altında iken öldürülmüş ve soleus kasları izole edilmiştir. İzole edilen kaslar buz üzerinde temizlendikten sonra ağırlıkları hassas tartı ile belirlenmiştir. Polietilen tüpler

içerisinde likit nitrojene daldırılarak dondurulan dokular analiz edilinceye kadar -80°C dondurucuda saklanmıştır.

3.3.2. RNA İzolasyonu

DNaz-RNaz'lardan arındırılmış polietilen (Steril PE) tüplere 50mg soleus kası, 10 kat hacimde TRIzol Reagent (Ambion, Life Technologies; Katalog no: 15596-018) ve 50mg DNaz-RNaz'lardan arındırılmış zirkonyum oksit boncuklar (2mm, Next Advance) konmuştur. Dokular mekanik homojenizatör (Bullet Blender Storm, Next Advance) ile homojenize edildikten sonra homojenatlar steril PE tüplere alınmıştır. Daha sonra 12.000 xg hızda +4°C'de 2 dk süre ile santrifüj edildikten sonra süpernatantlar temiz steril PE tüplere aktarılmıştır. Süpernatantlardan RNA izolasyonu, PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, Katalog no: 12183020) kullanılarak üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda yapılmıştır.

3.3.3. RNA Konsantrasyon Belirlenmesi

RNA izolasyonu sonunda örnekler buz üzerinde bir süre bekletildikten sonra RNA konsantrasyonları florometrik olarak Qubit® RNA BR Assay Kit (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA; Katalog no: Q10210) ile Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) kullanılarak ölçülmüştür. RNA konsantrasyonları belirlenen örnekler, komplementer DNA (cDNA) sentezinde kullanılmak üzere tüm örneklerin son hacmi 10µl ve RNA konsantrasyonu 500ng/µl olacak şekilde eşitlenmiş ve geriye kalan RNA'lar -80°C dondurucuda saklanmıştır.

3.3.4. cDNA Sentezi

İzolasyon sonrası elde edilen tek zincirli RNA molekülü oldukça hassas bir yapıya sahip olması nedeni ile kolayca degrade olabilmektedir. Bu nedenle RNA'nın, devam eden işlemlerin yapılabilmesi için ters transkriptaz enzimi ile daha sağlam bir yapıya sahip olan cDNA'ya dönüştürülmesi gerekmektedir. Ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA; Katalog no: 4368813) kullanılmıştır. Sentez için gereken reaktifler üretici firmanın belirlediği (Tablo

3.2) hacimlerde, toplam hacim 10µl olmak üzere PCR plakasına yüklenmiştir. Bu plakada her örneğe ait kuyulara RNA konsantrasyonları eşitlenmiş örneklerden 10µl eklendiğinde reaksiyon hacmi 20µl olmuştur. Kısa süreli spin yapılarak kuyular içerisindeki hava kabarcıklarından arındırılan plaka, termal döngü cihazına (Veriti®, Applied Biosystems, Foster City, CA) yerleştirilmiş ve inkübasyon için Tablo 3.3'de verilen protokol uygulanmıştır. Elde edilen cDNA'lardan geriye kalanlar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.2. cDNA sentezi için gereken reaktif hacimleri

Reaktif	Hacim (µl)
10xRT tamponu	2
dNTP karışımı	0,8
Randomize primerler	2
Ters Transkriptaz	1
Nükleazlardan arındırılmış dH ₂ O	4,2
Toplam Hacim	10

Tablo 3.3. cDNA sentezi için uygulanan termal döngü protokolü

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (dk)	10	120	5	∞

3.3.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

TVT'nin, immobizasyon sonrası soleus kasında protein sentezine ilişkin bazı genlerin ifadenmesi üzerine etkisi kantitatif RT-PCR (ViiA™ 7 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA) analizi ile belirlenmiştir. Steril 96 kuyuluk PCR plakalarına her örnekten iki defa yüklenen cDNA'lar, TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA)'ler kullanılarak analiz edilmiştir. RT-PCR sonuçları *housekeeping* gen olarak seçilen β-aktin

(Applied Biosystems, Foster City, CA; Rn00667869_m1) ile normalize edilmiş ve ViiA™ 7 Software v1.2.4 yazılımı ile $\Delta\Delta C_T$ değerleri hesaplanmıştır.

3.3.6. Protein Analizi

Soleus kasından 50mg alınarak 100mM HEPES (pH 7.9), 10mM KCl, 0,1mM EDTA (pH 8.0), 0,5mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, 1mM DTT 0,1mM PMSF, 0.05% NP40, posfotaz 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 ayrılmıştır. Çekirdek proteinlerinin analizi için daha önce -80°C'de saklanan pelletler 10 kat volümde liziz tamponu (20Mm HEPES pH 7.9, 420Mm NaCl, 0,1mM EDTA, 1,5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,5mM PMSF, %25 gliserol) ile karıştırılmıştır. Otuz dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 10.000 xg'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve ardından süpernatantlar polietilen tüplere konarak analizler yapıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.3.7. Western Blot Analizi

Soleus kasında MAFbx, p-FoxO3a, FoxO3a, mTOR, p-Akt1, p-4EBP1, AMPK, Hsp72 ve Hsp25 protein miktarı poliakrilamid jel elektroforezi ve immünoblot teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin protein içerikleri belirlendikten sonra 45µg protein, moleküler ağırlıklarına göre değişen yüzdelere sahip (% 12, % 10, % 5) tek boyutlu sodium dodecyl sulfate poliakrilamide jel elektroforezi (SDS-PAGE)'ne yüklenmiştir. Proteinler elektroforez sistemi (Bio-Rad, mini protean) ile 1,5-2 saat süreyle moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Ardından proteinler 0,45µm kalınlığında nitroselüloz membranlara (BioRad), yarı kuru transfer sistemi (Trans-Blot Turbo, BioRad) ile 20V elektrik akımında 30 dakika süresince transfer edilmiştir. Transfer işlemi tamamlanan membranlar, TTBS ile yıkandıktan sonra içerisinde % 5 BSA ya da kuru süt içeren TTBS ile 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklama işleminden sonra tekrar TTBS ile yıkanan membranlar Tablo 3.4'de sunulan birincil antikolar ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda 1 saat oda sıcaklığı ya da +4°C'de bütün gece inkübe edilmiştir.

Tablo 3.4. Blotlama işleminde kullanılan birincil antikorlar

Protein	Moleküler Ağırlık (kDa)	Üretici Firma	Katalog No
MAFbx		BioVision	3535-100
MuRF1	41-44	R&D Systems	AF5366
p-FoxO3a (Ser253)	97	Cell Signaling	9466
mTOR (7C10)	289	Cell Signaling	2983
p-Akt (Ser473) (193H12)	60	Cell Signaling	4058
p-4EBP1(Thr37/46) (236B4)	15-20	Cell Signaling	2855
p-AMPK α (Thr172) (D79.5E)	62	Cell Signaling	4188
AMPK α (23A3)	62	Cell Signaling	2603
Hsp72	72	Stressgen	SPA810
Hsp25	25	Stressgen	SPA801

Birincil antikorlar ile inkübasyon tamamlandıktan sonra yıkanan membranlar *Horse Radish Peroxidase* (HRP) ya da *Alkaline phosphatase* (AP)'a konjuge ikincil antikorlar ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir. İkincil antikor inkübasyonu sonrasında membranlar TTBS ile yıkandıktan sonra protein bantları kemilüminesans substrat (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, Katalog No: 170-5061) ya da bromochloroindolyl phosphate-nitro blue tetrazolium substratı (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad, Katalog No: 170-6432) kullanılarak görüntülenmiştir. Protein bantlarının miktarsal tayinleri Image J, NIH görüntü analizi (Schneider, 2012) ile belirlenmiştir (175).

3.3.8. Verilerin Analizi

Değişkenler ortalama ve standart hata şeklinde ifade edilmiştir. İki deneme fazla sayıda grubun karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi ve ikili karşılaştırmalar için ise Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Vücut ağırlıklarındaki zamana bağlı değişim, ikiden fazla zaman dilimi için Çift Yönlü Varyans Analizi

ile iki grup için Eşleştirilmiş İki Örnek Testi ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışma, alçılama yolu ile uygulanan immobilizasyon ve TVT'nin iskelet kası atrofisinde rol oynayan bazı sinyal molekülleri üzerine etkisini ve remobilizasyon sürecinde uygulanan TVT'nin bu molekülleri nasıl etkileyeceğini incelemek amacı ile yapılmıştır. Otuz adet dişi Wistar cinsi sıçan; K, İ, İR, İT ve T olmak üzere beş gruba eşit olarak dağıtılmıştır (n=6). İ, İR ve İT gruplarındaki hayvanlara iki hafta süre ile immobilizasyon uygulanmıştır. İR grubu sıçanlar iki haftalık immobilizasyonu takiben kafeste serbest bırakılırken, İT grubu hayvanlara remobilizasyon sürecinde 45Hz frekans ve 3mm genlikteki TVT uygulaması yapılmıştır.

K, İ, İR, İT ve T gruplarından elde edilen soleus kasında, RT-PCR kullanılarak protein döngüsünün negatif düzenleyicileri olan MuRF1, MAFbx, FoxO3a, FoxO1, AMPK ve miyostatin ve pozitif düzenleyicileri olan mTOR, Akt1, p70S6K gen ifadeleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, mTOR, Akt1, p4EBP1, total AMPK, pAMPK, pFoxO3, MuRF1, MAFbx, Hsp72 ve Hsp25 moleküllerinin protein ekspresyonu da Western Blot yöntemi ile incelenmiştir. Böylece, protein sentez ve yıkımında rol oynayan ve birbirleri ile kompleks bir ilişki içerisinde olan moleküllerin mRNA ve protein düzeyleri birlikte değerlendirilmiştir. Aynı zamanda immobilizasyon ve TVT'ye verilen yanıt ve bu yanıtların remobilizasyon sürecinde nasıl değiştiğine ilişkin genel bir çerçeveden bakılabilmektedir.

4.1. Vücut ve Kas Ağırlıkları Bulguları

Tablo 4.1'de tüm grupların deneyler öncesi, 14 günlük immobilizasyon sonrası (14. gün) ve immobilizasyonu takip eden 1 haftalık remobilizasyon ya da TVT sonrası vücut ağırlıkları değişimi sunulmuştur.

Tablo 4.1. Deney hayvanları vücut ağırlıkları (VA).

	Başlangıç VA (gr)	14. Gün VA (gr)	21. Gün VA (gr)
Gruplar	X±SE	X±SE	X±SE
K	211,78±7,56	226,25±8,12	-
İ	211,01±6,21	186,31±2,21	-
İR	245,10±3,4	218,17±5,89	228,05±5,91
İT	248,45±7,89	217,03±8,93	237,62±7,25
T	250,22±12,75	-	246,50±11,17

Tablo 4.1’de deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının ortalama ve standart hata değerleri sunulmuştur. İmmobilizasyon uygulanan grupların tümünde 14. gündeki vücut ağırlıkları anlamlı düzeyde azalmıştır. Grupların başlangıç vücut ağırlıkları ile karşılaştırılmalarından elde edilen anlamlılık düzeyleri sırasıyla; İ grubu için $p=0,006$, İR için $p=0,006$ ve İT grubu için $p=0,001$ ’dir. İR grubu vücut ağırlıkları immobilizasyonu takip eden remobilizasyon sonunda (21. gün) kısmen artmış olsa da, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,306$). Ancak immobilizasyon sonrasında bir hafta süresince uygulanan TVT’nin vücut ağırlıklarını İT grubunda arttırdığı görülmektedir ($p=0,008$). Yalnızca TVT uygulanan T grubu vücut ağırlıklarında herhangi bir değişim olmamıştır ($p=0,102$).

Tablo 4.2’de tüm gruplardaki hayvanların soleus kas ağırlıkları ve vücut ağırlıklarına oranı, Tablo 4.3’de soleus kas ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırmaları ve Tablo 4.4’de ise soleus kas ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranının grup karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 4.2. Soleus kas ağırlıkları ve vücut ağırlıklarına oranları (VA).

Gruplar	Soleus (gr)		Soleus/VA (x10.000)	
	X±SE	p=0,001	X±SE	p=0,019
K	0,0977±0,0056		4,30±0,11	
İ	0,0608±0,0039		3,26±0,18	
İR	0,0912±0,0090		4,00±0,39	
İT	0,0857±0,0055		3,60±0,18	
T	0,1005±0,0058		4,08±0,16	

Tablo 4.3. Tüm grupların Soleus kas ağırlığı karşılaştırmaları.

Gruplar	Soleus Ağırlığı (gr)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,003	p= 0,945	p= 0,656	p= 0,998
İ			p= 0,016	p= 0,064	p= 0,001
İR				p= 0,970	p= 0,825
İT					p= 0,461
T					

Tablo 4.3'de görüldüğü gibi soleus ağırlıkları yalnızca İ grubunda K grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır (p=0,003). Buna karşın immobilizasyon sonrasında soleus kas kitesi İR grubunda İ grubuna göre anlamlı bir artış saptanmıştır (p=0,016).

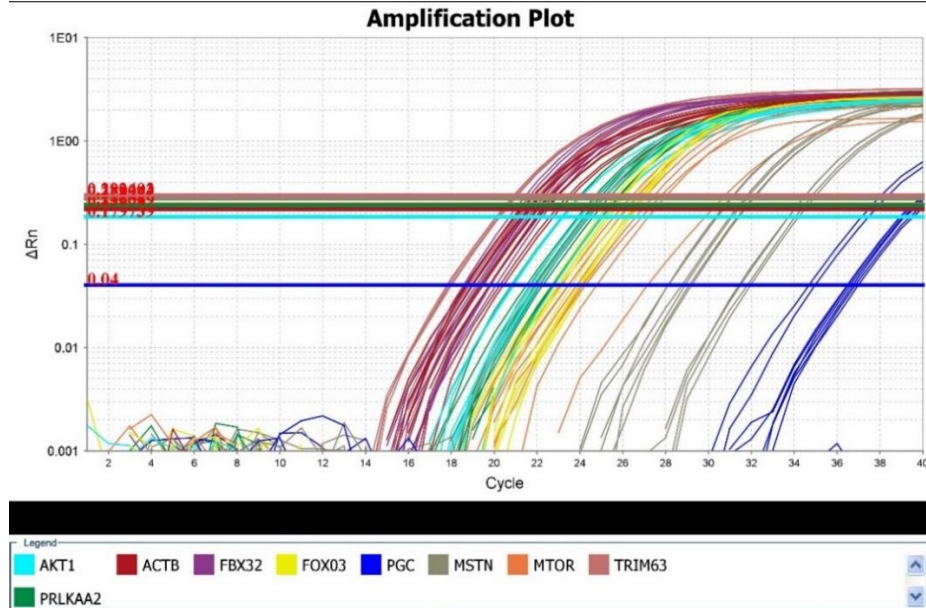
Tablo 4.4. Tüm grupların Soleus/VA karşılaştırmaları.

Gruplar	Soleus/VA (gr) (x10.000)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,020	p= 0,878	p= 0,196	p= 0,959
İ			p= 0,147	p= 0,806	p= 0,089
İR				p= 0,690	p= 0,999
İT					p= 0,531
T					

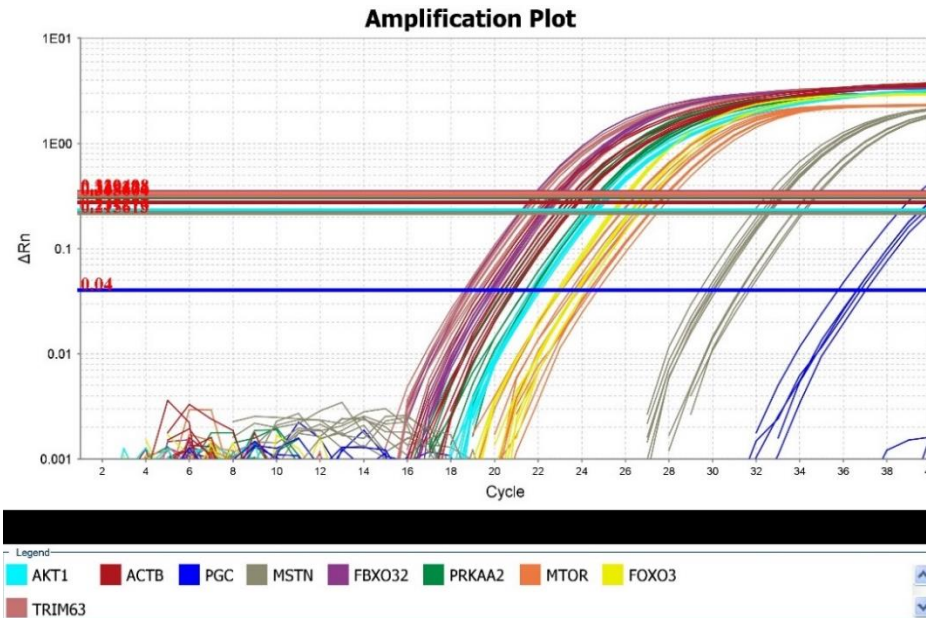
Soleus/VA oranına ilişkin tabloya (Tablo 4.4) bakıldığında, İ grubunda K grubuna göre anlamlı bir azalma görülmektedir (p=0,020).

4.2. Gen Ekspresyonu Bulguları

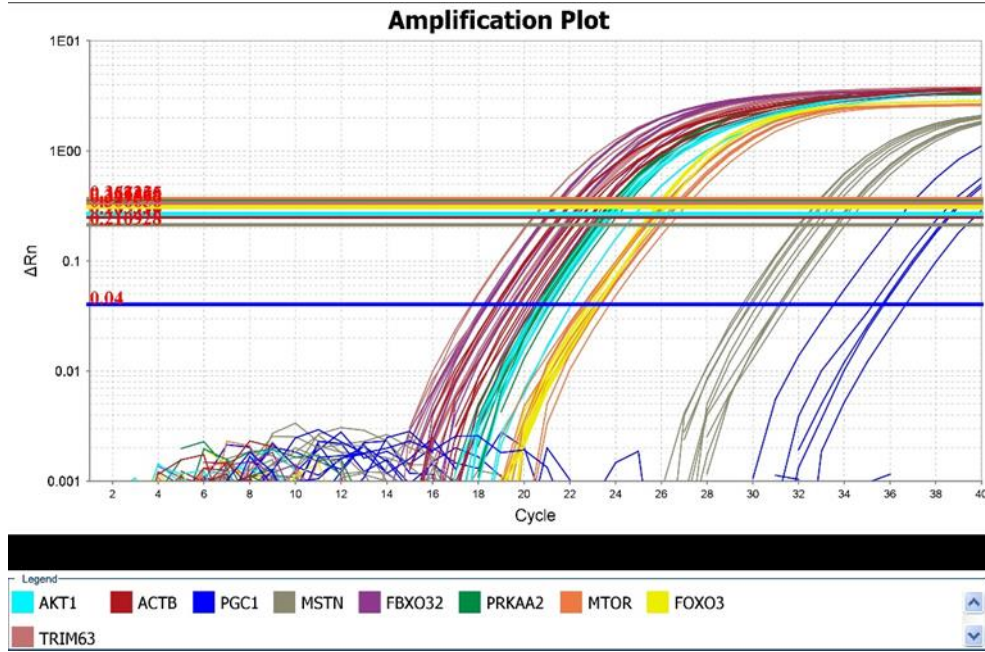
Şekil 4.1-4.6'da Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları amplifikasyon grafikleri verilmiştir.



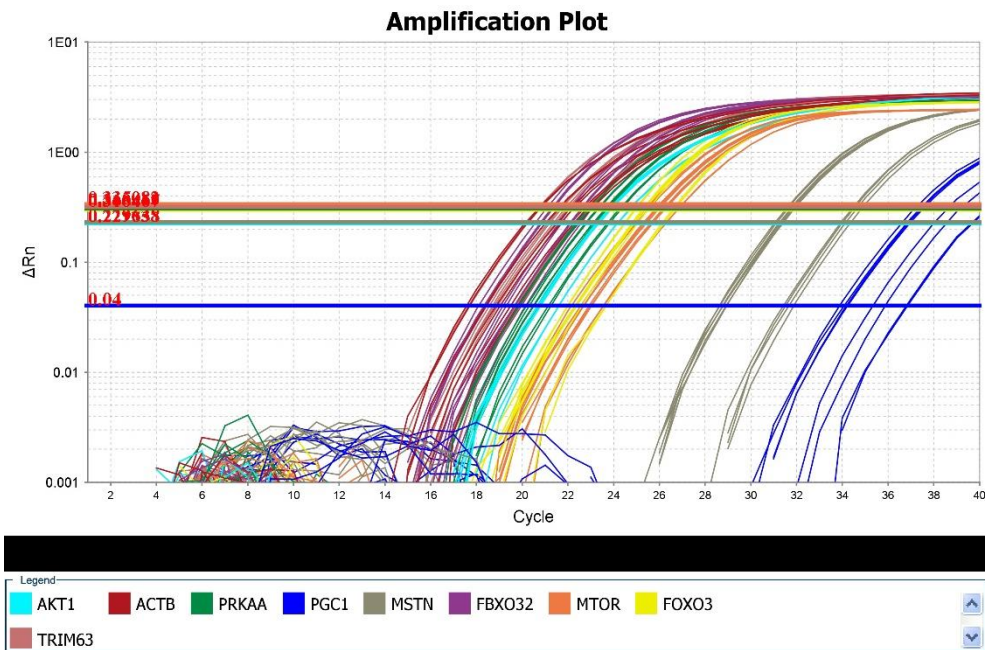
Şekil 4.1. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 1. amplifikasyon grafiği.



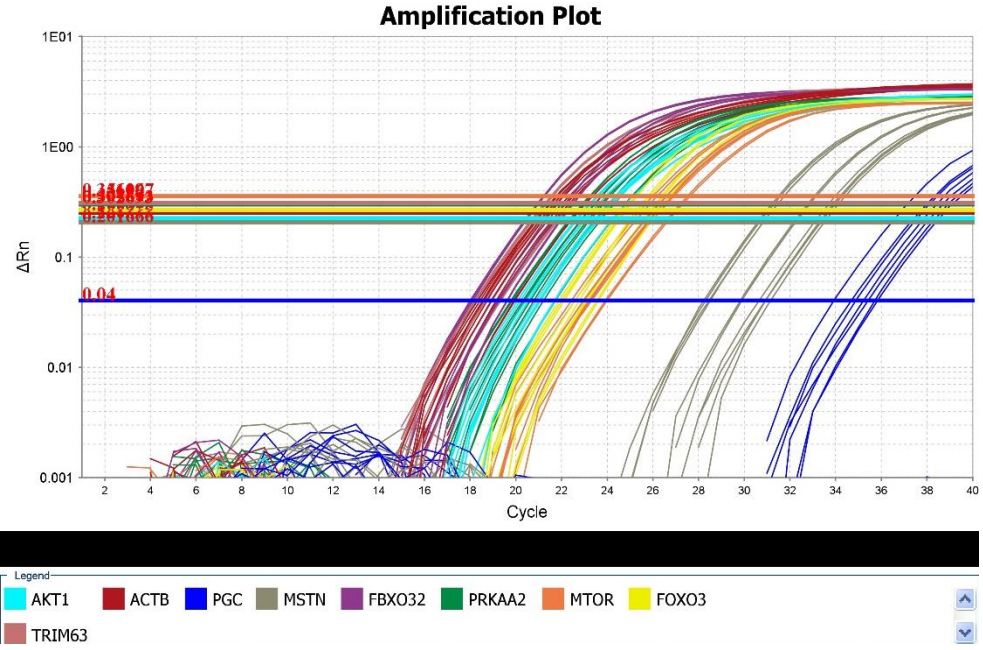
Şekil 4.2. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 2. amplifikasyon grafiği.



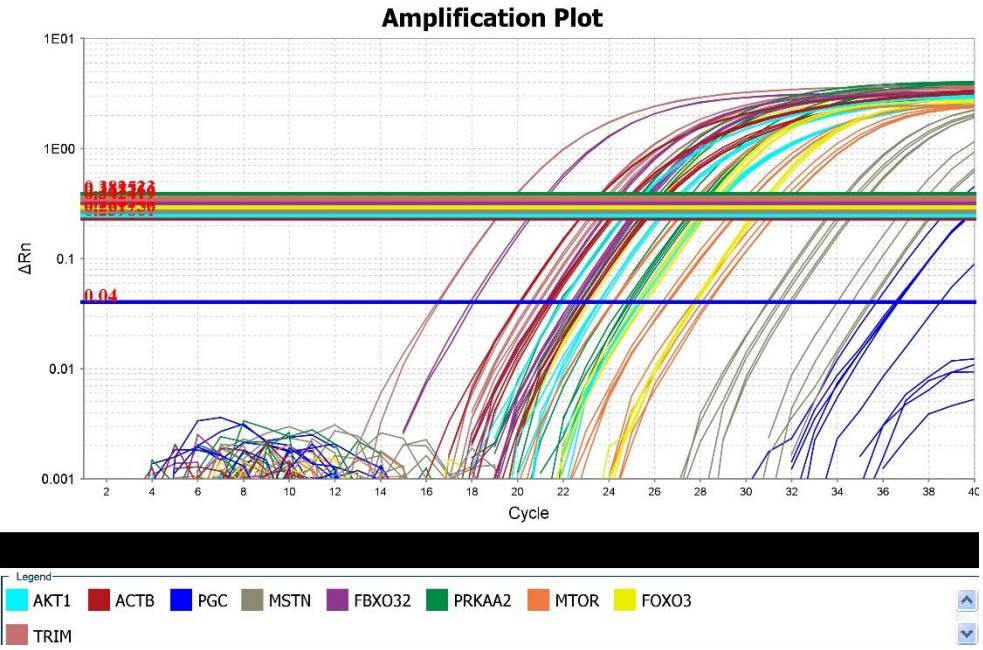
Şekil 4.3. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 3. amplifikasyon grafiği.



Şekil 4.4. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 4. amplifikasyon grafiği.

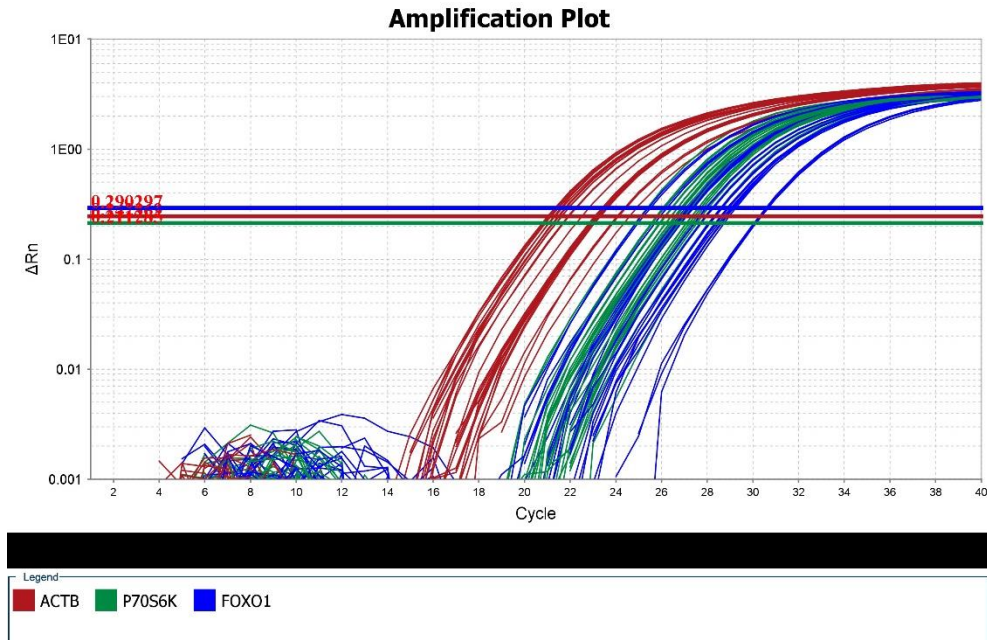


Şekil 4.5. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 5. amplifikasyon grafiği.

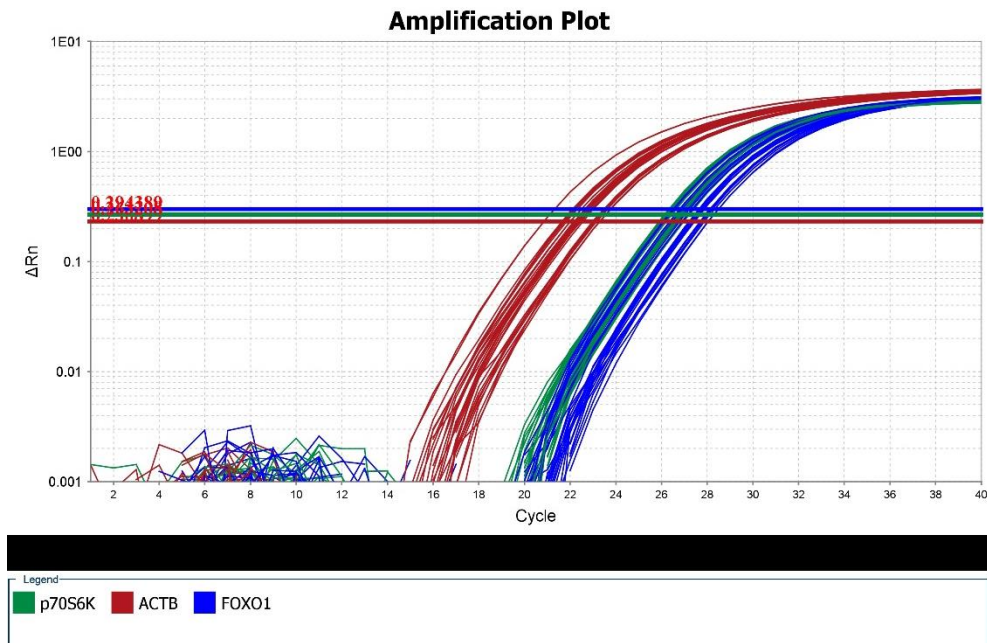


Şekil 4.6. Akt1, miyostatin, MAFbx, AMPK, mTOR, FoxO3a ve MuRF1 gen ekspresyonları için 6. amplifikasyon grafiği.

Şekil 4.7-4.8'de FoxO1 ve p70S6K gen ekspresyonları amplifikasyon grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.7. FoxO1 ve p70S6K genleri için 1. amplifikasyon grafiği.



Şekil 4.8. FoxO1 ve p-70S6K genleri için 2. amplifikasyon grafiği.

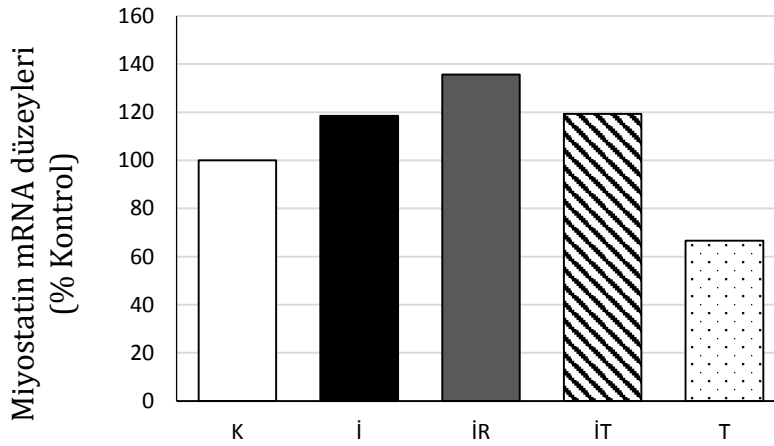
Tablo 4.5’de miyostatin gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Relatif miktar) değerleri verilmiştir.

Tablo 4.5. Miyostatin gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,28
	X \pm SE	X \pm SE	
K	10,70 \pm 0,55	1,35 \pm 0,40	
İ	10,10 \pm 0,22	1,60 \pm 0,22	
İR	9,94 \pm 0,29	1,84 \pm 0,28	
İT	10,35 \pm 0,43	1,61 \pm 0,56	
T	10,99 \pm 0,27	0,90 \pm 0,18	

Miyostatin gen ekspresyonlarında gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,28).

İmmobilizasyon ve TVT’nin miyostatin gen ekspresyonu üzerine olan etkisini gösteren grafik Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. İmmobilizasyon ve TVT’nin miyostatin gen ekspresyonu üzerine etkisi.

Tablo 4.6’de MuRF1 gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ve Tablo 4.7’de gruplar arası karşılaştırmalar ve anlamlılık düzeyleri verilmiştir.

Tablo 4.6. MuRF1 gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,001
	X \pm SE	X \pm SE	
K	-1,610 \pm 0,15	1,03 \pm 0,12	
İ	0,116 \pm 0,40	0,36 \pm 0,10	
İR	0,385 \pm 0,38	0,30 \pm 0,09	
İT	0,493 \pm 0,48	0,31 \pm 0,11	
T	-0,827 \pm 0,23	0,62 \pm 0,10	

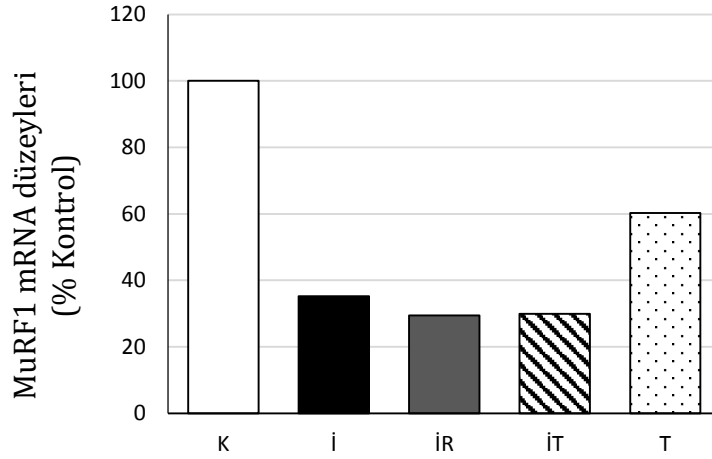
Tablo 4.6'daki MuRF1 gen ekspresyon değerlerinde gruplar arası anlamlı fark vardır (p=0,001).

Tablo 4.7. MuRF1 gen ekspresyon düzeylerinin grup karşılaştırmaları.

Gruplar	MuRF1 mRNA düzeyleri				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,014	p= 0,004	p= 0,002	p= 0,518
İ			p= 0,981	p= 0,938	p= 0,337
İR				p= 0,999	p= 0,133
İT					p= 0,086
T					

MuRF1 gen ekspresyonlarının İ, İR ve İT gruplarının K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir (p<0,05).

İmmobilizasyon ve TVT'nin MuRF1 gen ekspresyonu üzerine olan etkisini gösteren grafik Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. İmmobilizasyon ve TVT'nin MuRF1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.

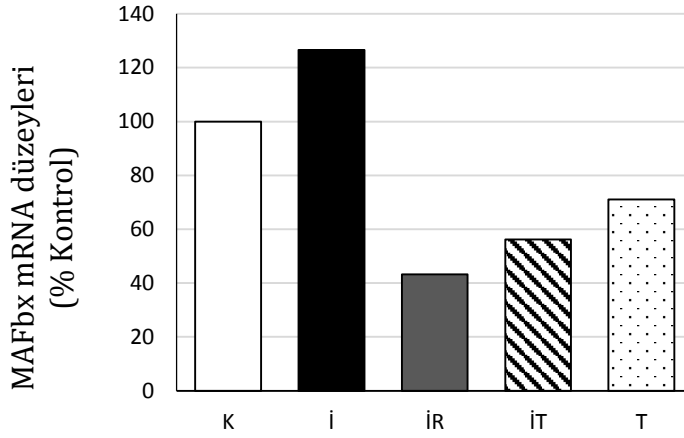
Tablo 4.8'de MAFbx gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.8. MAFbx gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,12
	X \pm SE	X \pm SE	
K	-0,62 \pm 0,24	1,08 \pm 0,21	
İ	-0,27 \pm 0,60	1,37 \pm 0,79	
İR	0,95 \pm 0,56	0,47 \pm 0,15	
İT	0,40 \pm 0,42	0,61 \pm 0,17	
T	-0,19 \pm 0,16	0,77 \pm 0,09	

Tablo 4.8'de görüldüğü gibi MAFbx gen ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırmaları anlamlı değildir (p=0,12).

İmmobilizasyon ve TVT'nin MAFbx gen ekspresyonu üzerine olan etkisini gösteren grafik Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. İmmobilizasyon ve TVT'nin MAFbx gen ekspresyonu üzerine etkisi.

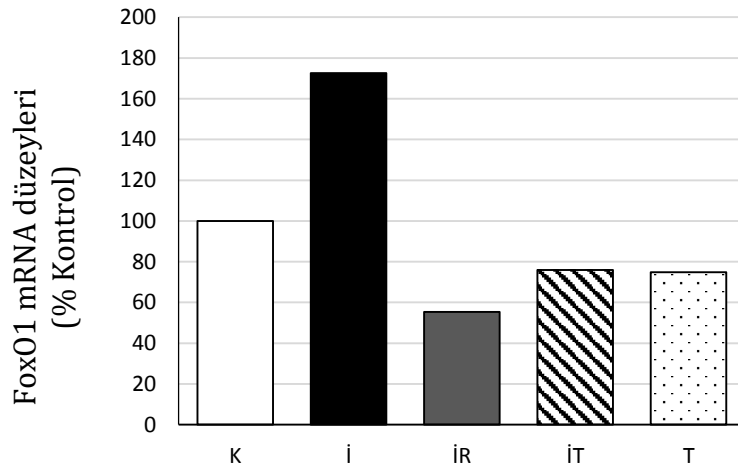
Tablo 4.9'da FoxO1 gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.9. FoxO1 gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,20
	X \pm SE	X \pm SE	
K	5,19 \pm 0,46	1,27 \pm 0,38	
İ	4,54 \pm 0,48	2,20 \pm 0,98	
İR	5,87 \pm 0,36	0,70 \pm 0,12	
İT	5,52 \pm 0,36	0,97 \pm 0,32	
T	5,34 \pm 0,21	0,95 \pm 0,13	

FoxO1 gen ekspresyonlarında gruplar arası anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,20).

Şekil 4.12'de immobilizasyon ve TVT'nin FoxO1 gen ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.12. İmmobilizasyon ve TVT'nin FoxO1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.

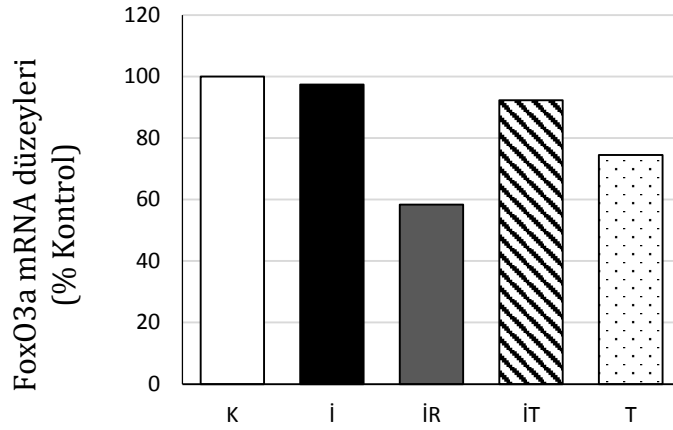
Tablo 4.10'da FoxO3a gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.10. FoxO3a gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,74
	X \pm SE	X \pm SE	
K	3,67 \pm 0,41	1,20 \pm 0,29	
İ	3,81 \pm 0,44	1,17 \pm 0,42	
İR	4,30 \pm 0,27	0,70 \pm 0,11	
İT	3,75 \pm 0,34	1,10 \pm 0,32	
T	3,96 \pm 0,28	0,89 \pm 0,17	

Tablo4.10'da görüldüğü gibi FoxO3a gen ekspresyonlarında gruplar arası anlamlı fark yoktur (p=0,74).

İmmobilizasyon ve TVT'nin FoxO3a gen ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. İmmobilizasyon ve TVT'nin FoxO3a gen ekspresyonu üzerine etkisi.

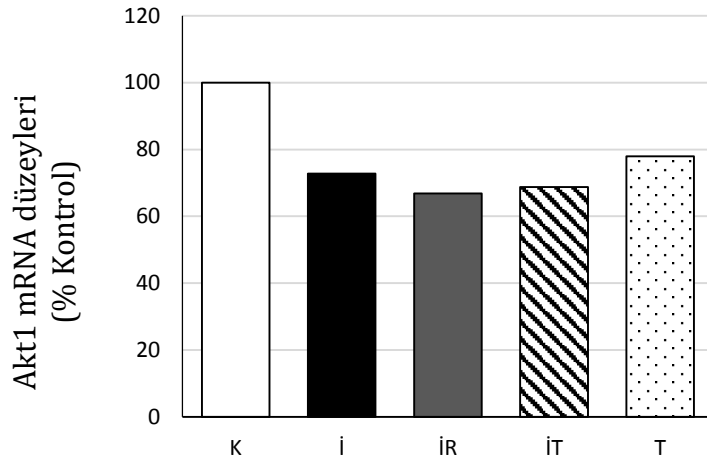
Tablo 4.11'de Akt gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.11. Akt gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,61
	X \pm SE	X \pm SE	
K	1,45 \pm 0,30	1,11 \pm 0,21	
İ	1,97 \pm 0,33	0,80 \pm 0,20	
İR	2,02 \pm 0,31	0,74 \pm 0,11	
İT	1,98 \pm 0,25	0,76 \pm 0,16	
T	1,75 \pm 0,22	0,86 \pm 0,13	

Tablo 4.11'de görüldüğü gibi Akt gen ekspresyonlarında gruplar arası anlamlı fark yoktur (p=0,61).

Şekil 4.14’de immobilizasyon ve TVT’nin Akt1 gen ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.14. İmmobilizasyon ve TVT’nin Akt1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.

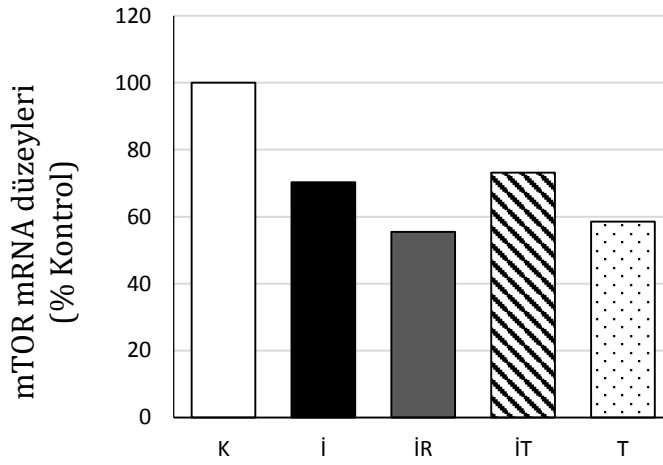
Tablo 4.12’de mTOR gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.12. mTOR gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,58
	X \pm SE	X \pm SE	
K	4,38 \pm 0,42	1,20 \pm 0,29	
İ	4,77 \pm 0,27	0,84 \pm 0,16	
İR	5,26 \pm 0,48	0,66 \pm 0,14	
İT	4,88 \pm 0,40	0,87 \pm 0,28	
T	5,11 \pm 0,37	0,70 \pm 0,15	

Tablo 4.12’de görüldüğü gibi mTOR gen ekspresyonlarında gruplar arası anlamlı fark yoktur (p=0,58).

Şekil 4.15'te immobilizasyon ve TVT'nin mTOR gen ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.15. İmmobilizasyon ve TVT'nin mTOR gen ekspresyonu üzerine etkisi.

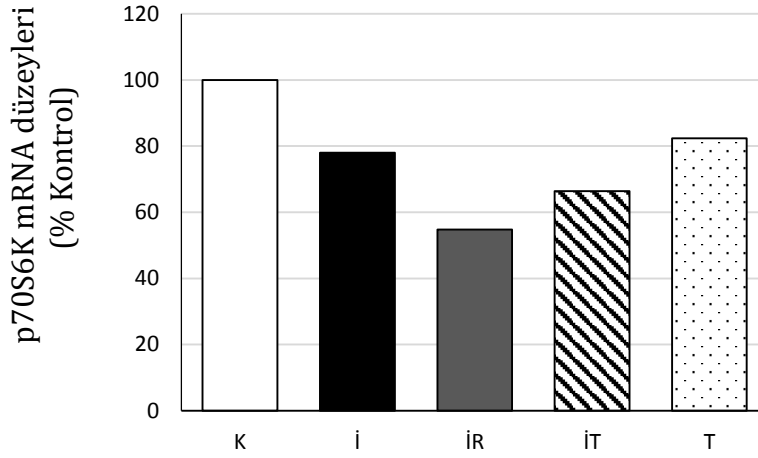
Tablo 4.13'de p70S6K gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.13. p70S6K gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,13
	X \pm SE	X \pm SE	
K	3,84 \pm 0,26	1,08 \pm 0,19	
İ	4,20 \pm 0,27	0,84 \pm 0,15	
İR	4,70 \pm 0,27	0,59 \pm 0,08	
İT	4,43 \pm 0,26	0,72 \pm 0,13	
T	4,02 \pm 0,09	0,89 \pm 0,05	

Tablo 4.13'de görüldüğü gibi p70S6K gen ekspresyonlarında gruplar arası fark anlamlı değildir (p=0,13).

İmmobilizasyon ve TVT'nin p70S6K gen ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.16. İmmobilizasyon ve TVT'nin p70S6K gen ekspresyonu üzerine etkisi.

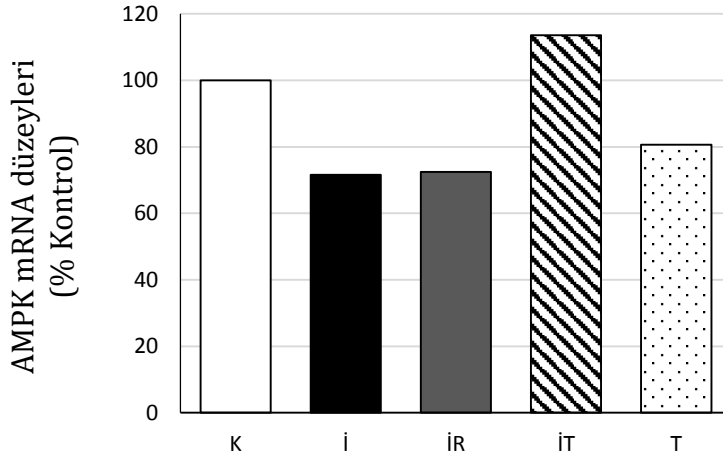
Tablo 4.14'de AMPK gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.14. AMPK gen ekspresyonu ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

Gruplar	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p=0,78
	X \pm SE	X \pm SE	
K	1,80 \pm 0,33	1,14 \pm 0,25	
İ	2,25 \pm 0,32	0,81 \pm 0,16	
İR	2,41 \pm 0,53	0,82 \pm 0,18	
İT	1,86 \pm 0,46	1,29 \pm 0,54	
T	2,03 \pm 0,24	0,92 \pm 0,16	

Tablo 4.14'te görüldüğü gibi AMPK gen ekspresyonlarında gruplar arası anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0,78).

İmmobilizasyon ve TVT'nin AMPK gen ekspresyonu üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. İmmobilizasyon ve TVT'nin AMPK gen ekspresyonu üzerine etkisi.

4.3. Protein Analizi Bulguları

Tablo 4.15'te tüm grupların MuRF1 optik dansite yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 4.15. Tüm grupların MuRF1 optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,000
K	1,0±0,10	
İ	1,82±0,12	
İR	1,59±0,22	
İT	1,54±0,12	
T	0,82±0,09	

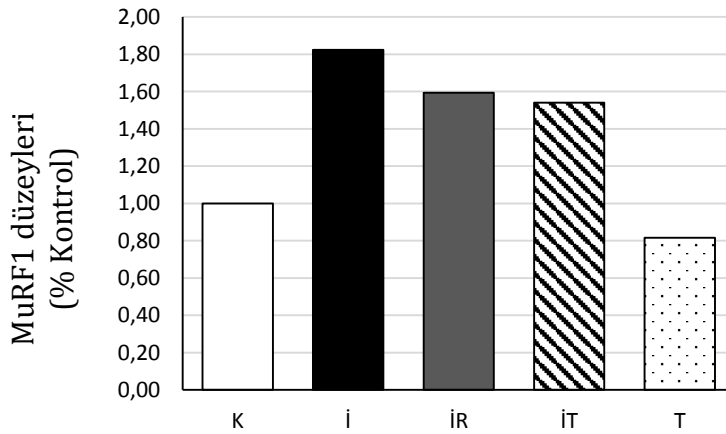
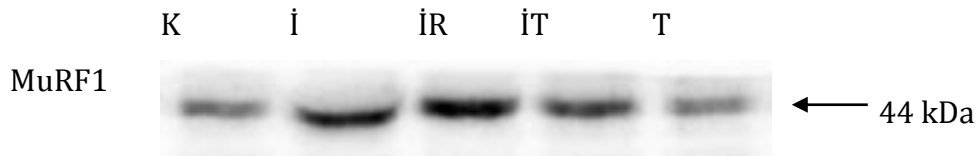
Tablo 4.15'te MuRF1 protein düzeylerinde gruplar arasında fark olduğu görülmektedir. Tablo 4.16'da ise gruplar arası karşılaştırmalar verilmiştir.

Tablo 4.16. Tüm grupların MuRF1 optik dansite karşılaştırmaları.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,003	p= 0,044	p=0,076	p= 0,883
İ			p= 0,761	p= 0,606	p= 0,000
İR				p= 0,999	p= 0,005
İT					p= 0,009
T					

Gruplar arası karşılaştırmalarda İ ve İR gruplarındaki MuRF1 protein düzeylerinin K grubuna göre anlamlı olarak arttığı görülmektedir ($p<0,05$).

Şekil 4.18'de immobilizasyon ve TVT'nin, MuRF1 protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik verilmiştir.

**Şekil 4.18.** Immobilizasyon ve TVT'nin MuRF1 protein düzeyleri üzerine etkisi.**Şekil 4.19.** MuRF1 Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.17’de tüm grupların MAFbx optik dansite yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 4.17. Tüm grupların MAFbx optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,007
K	1,0±0,13	
İ	1,57±0,11	
İR	1,19±0,12	
İT	0,85±0,11	
T	1,22±0,19	

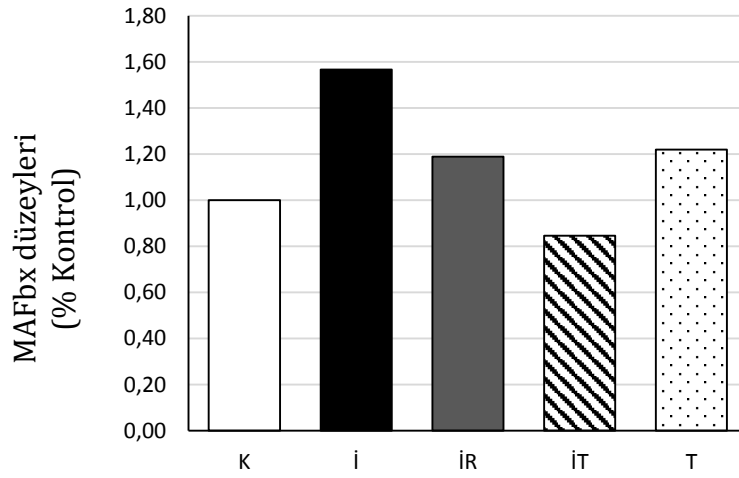
Tablo 4.17’de MAFbx protein düzeylerinde gruplar arasında fark olduğu görülmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalar sonucu elde edilen anlamlılık düzeyleri Tablo 4.18’de sunulmuştur.

Tablo 4.18. Tüm grupların MAFbx optik dansite karşılaştırmaları.

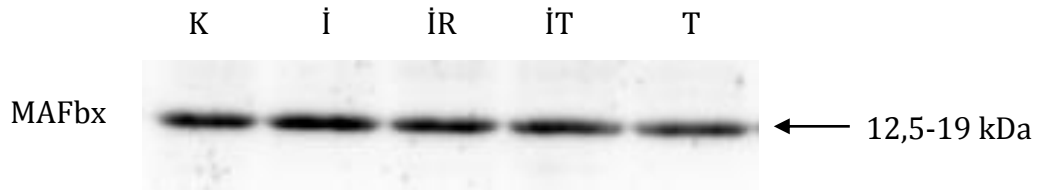
Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,041	p= 0,849	p=0,913	p= 0,575
İ			p= 0,289	p= 0,004	p= 0,641
İR				p= 0,347	p= 0,983
İT					p= 0,163
T					

Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi MAFbx protein düzeyleri İ grubunda K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır. Diğer yandan, İR grubunda İ grubuna göre MAFbx düzeyleri azalmış fakat anlamlı bulunmamıştır (p= 0,289). Ancak İT grubundaki azalmanın İ grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (p= 0,004).

İmmobilizasyon ve TVT'nin MAFbx protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. İmmobilizasyon ve TVT'nin MAFbx protein düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 4.21. MAFbx Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.19'da tüm grupların p-FoxO3a optik dansite yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 4.19. Tüm grupların p-FoxO3a optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,000
K	1,0±0,08	
İ	0,29±0,04	
İR	0,38±0,08	
İT	0,52±0,12	
T	0,77±0,06	

Yukarıdaki tabloda (Tablo 4.19), tüm grupların p-FoxO3a protein düzeylerine ilişkin değerler ve grup karşılaştırmaları verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel fark bulunmuş ve bu farkların anlamlılık düzeyleri Tablo 4.20’de sunulmuştur.

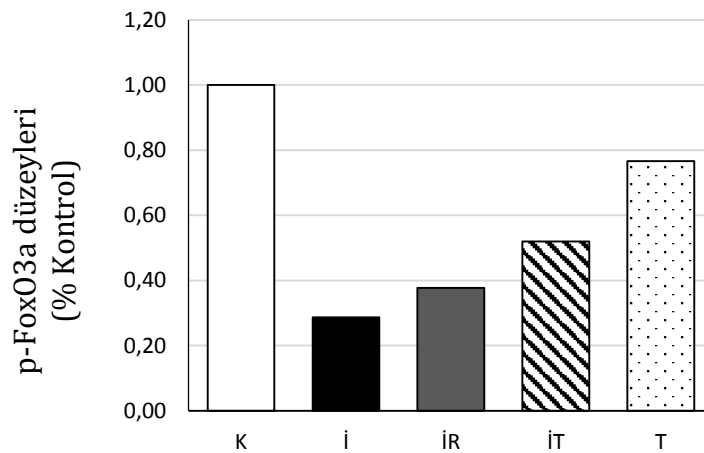
Tablo 4.20’de tüm grupların p-FoxO3a optik dansite karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 4.20. Tüm grupların p-FoxO3a optik dansite karşılaştırmaları.

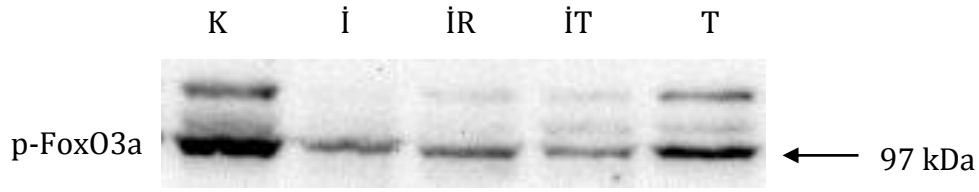
Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,000	p= 0,000	p= 0,002	p= 0,262
İ			p= 0,916	p= 0,256	p= 0,002
İR				p= 0,723	p= 0,017
İT					p= 0,226
T					

Tablo 4.20’de görüldüğü gibi p-FoxO3a protein düzeyleri K grubuna İ, İR ve İT gruplarında anlamlı olarak azalmıştır. Diğer yandan T grubu p-FoxO3a protein düzeyleri K grubuna göre daha düşük olmasına karşın bu fark anlamlı değildir (p= 0,262).

Şekil 4.22’de, immobilizasyon ve TVT’nin p-FoxO3a protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.22. Immobilizasyon ve TVT’nin p-FoxO3a protein düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 4.23. p-FoxO3a Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.21’de tüm grupların p-Akt1 optik dansite yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 4.21. Tüm grupların p-Akt1 optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,001
K	1,0±0,06	
İ	0,15±0,05	
İR	0,92±0,08	
İT	0,99±0,05	
T	0,96±0,08	

4.21’de, p-Akt1 protein düzeylerine ilişkin değerlerin gruplar arası karşılaştırmalarında p-Akt1 protein düzeylerinin farklı olduğu görülmektedir (p=0,001). Tablo 4.22’de ise, tüm grupların p-Akt1 optik dansite karşılaştırmaları verilmiştir.

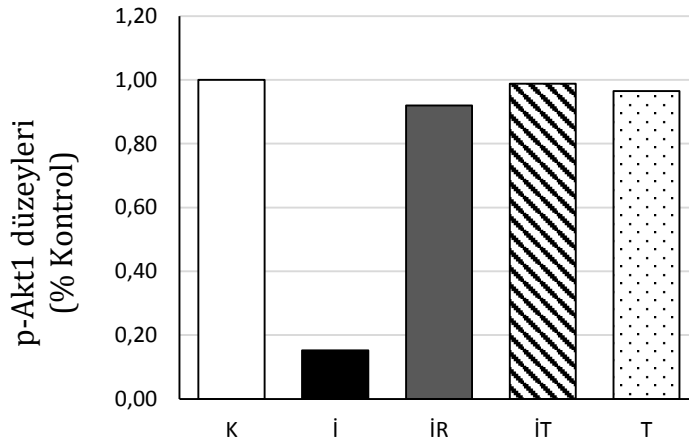
Tablo 4.22. Tüm grupların p-Akt1 optik dansite karşılaştırmaları.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,000	p= 0,907	p= 1,000	p= 0,996
İ			p= 0,000	p= 0,000	p= 0,000
İR				p= 0,946	p= 0,986
İT					p= 0,999
T					

Yukarıdaki tabloda (Tablo 4.2) görüldüğü gibi, p-Akt1 protein düzeyleri İ grubunda K grubuna göre önemli düzeyde azalmıştır (p= 0,000). Diğer yandan,

hem İR hem de İT gruplarında bu düzeylerin bir hafta sonunda İ grubuna göre artarak ($p= 0,000$ ve $p= 0,000$) kontrol düzeylerine döndüğü görülmektedir. Nitekim, K grubu ile İR ve İT gruplarının karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

İmmobilizasyon ve TVT'nin p-Akt1 protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4.24. İmmobilizasyon ve TVT'nin p-Akt1 protein düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 4.25. p-Akt1 Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.23'te tüm grupların mTOR optik dansite yüzdeleri, Tablo 4.24'te ise grup karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 4.23. Tüm grupların mTOR optik dansite yüzdeleri.

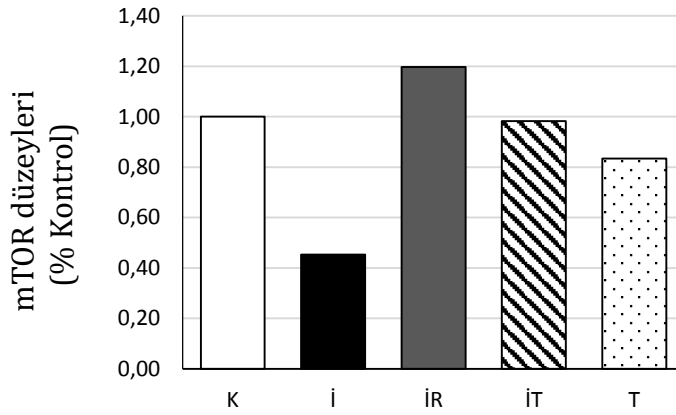
Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,008
K	1,0±0,07	
İ	0,45±0,08	
İR	1,20±0,18	
İT	0,98±0,13	
T	0,83±0,15	

Tablo 4.24. Tüm grupların mTOR optik dansite karşılaştırmaları.

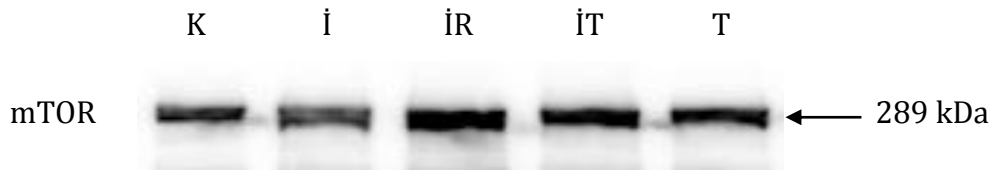
Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,050	p= 0,828	p= 1,000	p= 0,897
İ			p= 0,004	p= 0,061	p= 0,275
İR				p= 0,783	p= 0,321
İT					p= 0,927
T					

Tablo 4.24'te görüldüğü gibi mTOR protein düzeylerinin K grubu ile karşılaştırıldığında İ grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. Öte yandan, remobilizasyon gruplarının her ikisinde de bir hafta sonunda mTOR düzeyleri tekrar artış göstermiş ancak sadece İ ile İR grubu arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p= 0,004).

İmmobilizasyon ve TVT'nin mTOR protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.26'te verilmiştir.



Şekil 4.26. İmmobilizasyon ve TVT'nin mTOR protein düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 4.27. mTOR Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.25'de tüm grupların p-4EBP1 optik dansite yüzdeleri ve Tablo 4.26'da grup karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 4.25. Tüm grupların p-4EBP1 optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,001
K	1,0±0,1	
İ	0,18±0,06	
İR	0,48±0,04	
İT	0,7±0,07	
T	0,98±0,05	

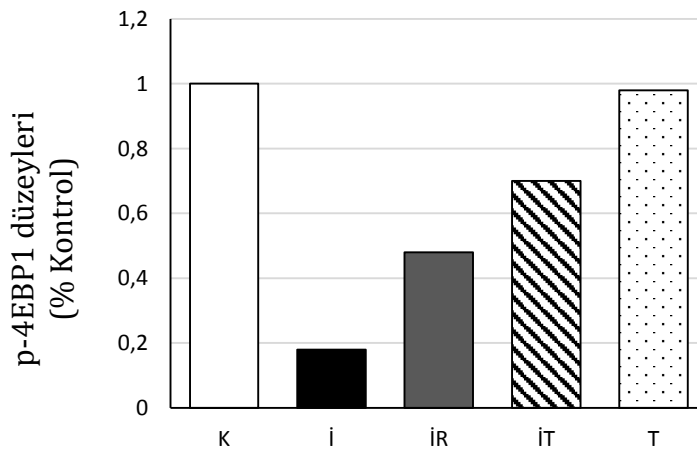
Tablo 4.25'te görüldüğü gibi p-4EBP1 grup karşılaştırmalarında anlamlı fark vardır ($p=0,001$). Gruplar arasındaki farklılıklara ilişkin anlamlılık düzeyleri Tablo 4.26'da verilmiştir.

Tablo 4.26. Tüm grupların p-4EBP1 optik dansite karşılaştırmaları.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		$p= 0,001$	$p= 0,001$	$p= 0,034$	$p= 0,999$
İ			$p= 0,040$	$p= 0,001$	$p= 0,001$
İR				$p= 0,149$	$p= 0,001$
İT					$p= 0,058$
T					

Tablo 4.26'da görüldüğü gibi p-4EBP1 protein düzeyleri her üç immobilizasyon grubunda da azalmıştır ($p<0,05$). Diğer yandan İ grubundaki azalma, bir haftalık remobilizasyon sonunda iki grupta da (İR ve İT) artış göstermiştir. Nitekim bu artışlar kontrol grubu değerlerinden hala düşük olsa da, İ grubu değerlerinden İR için $p=0,040$ ve İT grubu için $p=0,001$ anlamlı düzeylerinde yüksektir.

İmmobilizasyon ve TVT'nin p-4EBP1 protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.28. İmmobilizasyon ve TVT'nin p-4EBP1 protein düzeyleri üzerine etkisi



Şekil 4.29. p-4EBP1 Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.27’de tüm grupların p-AMPK/AMPK optik dansite yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 4.27. Tüm grupların p-AMPK/AMPK optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,002
K	1,0±0,17	
İ	0,36±0,09	
İR	0,76±0,15	
İT	1,34±0,22	
T	0,92±0,08	

Tablo 4.27’de görüldüğü gibi p-AMPK/AMPK grup karşılaştırmalarında anlamlı fark vardır (p=0,002). Gruplar arasındaki farklılıklara ilişkin anlamlılık düzeyleri Tablo 4.28’de verilmiştir.

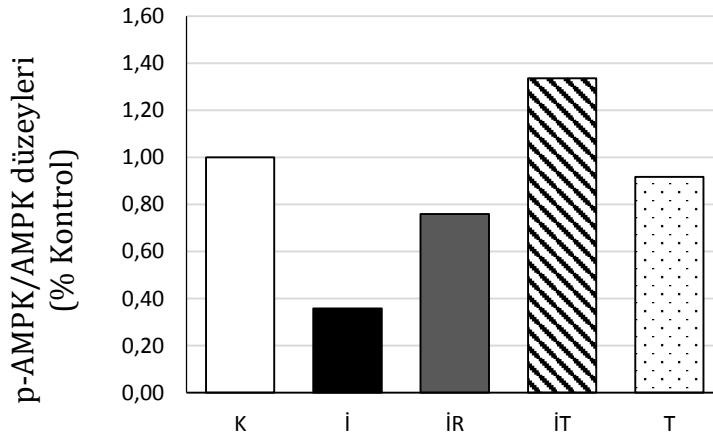
Tablo 4.28’de tüm grupların p-AMPK/AMPK optik dansite karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 4.28. Tüm grupların p-AMPK/AMPK optik dansite karşılaştırmaları.

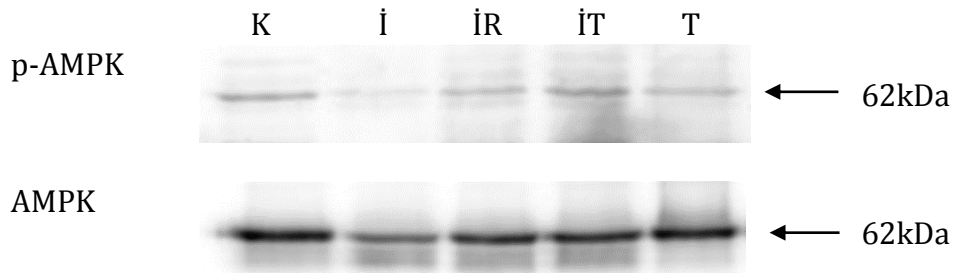
Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p=0,044	p=0,793	p=0,527	p=0,995
İ			p=0,354	p=0,001	p=0,099
İR				p=0,083	p=0,947
İT					p=0,312
T					

Tablo 4.28’de görüldüğü gibi p-AMPK/AMPK düzeyleri İ grubunda K grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Diğer yandan İ grubunda azalan AMPK fosforilasyonu TVT’nin etkisi ile İT grubunda artış göstermiştir. Buna göre, İ ve İT grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,001$).

Şekil 4.30’da immobilizasyon ve TVT’nin p-4EBP1 protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.30. Immobilizasyon ve TVT’nin AMPK fosforilasyonu üzerine etkisi.



Şekil 4.31. p-AMPK ve AMPK Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.29’da tüm grupların Hsp72 optik dansite yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 4.29. Tüm grupların Hsp72 optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p=0,001
K	1,0±0,06	
İ	0,49±0,03	
İR	1,00±0,05	
İT	0,61±0,12	
T	0,85±0,05	

Tablo 4.29’da görüldüğü gibi Hsp72 grup karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmuştur (p=0,001). Gruplar arasındaki farkların anlamlılık düzeyleri Tablo 4.30’da verilmiştir.

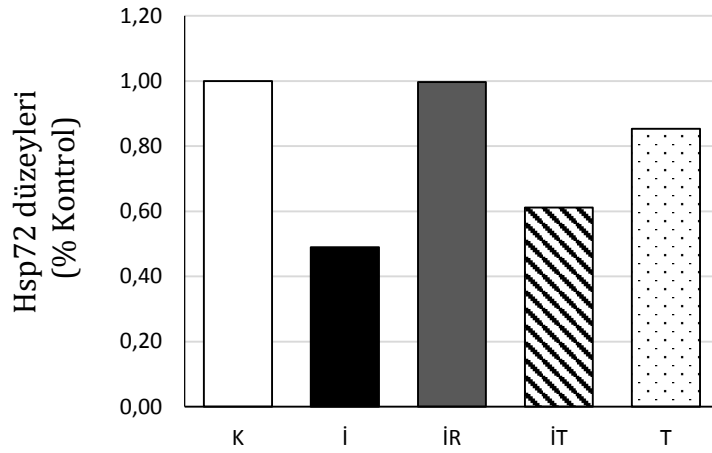
Tablo 4.30’da tüm grupların Hsp72 optik dansite karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 4.30. Tüm grupların Hsp72 optik dansite karşılaştırmaları.

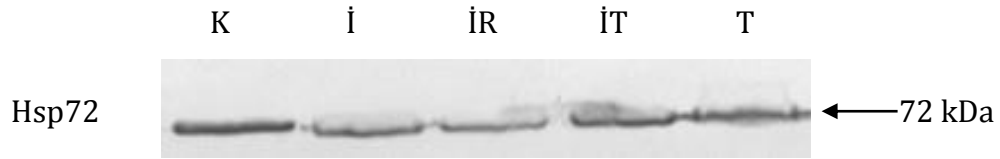
Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		p= 0,001	p= 1,000	p= 0,005	p= 0,587
İ			p= 0,001	p= 0,735	p= 0,010
İR				p= 0,006	p= 0,607
İT					p= 0,141
T					

Tablo 4.30’da görüldüğü gibi Hsp72 düzeyleri İ ve İT gruplarında K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır (p<0,05). Ayrıca, Hsp72 düzeylerinin İT grubunda İR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğu görülmektedir (p= 0,006).

İmmobilizasyon ve TVT'nin Hsp72 protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.32'de verilmiştir.



Şekil 4.32. İmmobilizasyon ve TVT'nin Hsp72 protein düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 4.33. Hsp72 Western Blot görüntüleri.

Tablo 4.31'de tüm grupların Hsp25 optik dansite yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 4.31. Tüm grupların Hsp25 optik dansite yüzdeleri.

Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)	
	X±SE	p= 0,001
K	1,0±0,13	
İ	0,56±0,10	
İR	1,84±0,17	
İT	1,64±0,18	
T	1,03±0,15	

Tablo 4.31’de görüldüğü gibi Hsp25 grup karşılaştırmalarında anlamlı fark vardır ($p=0,001$). Gruplar arasındaki farkların anlamlılık düzeyleri Tablo 4.30’da verilmiştir.

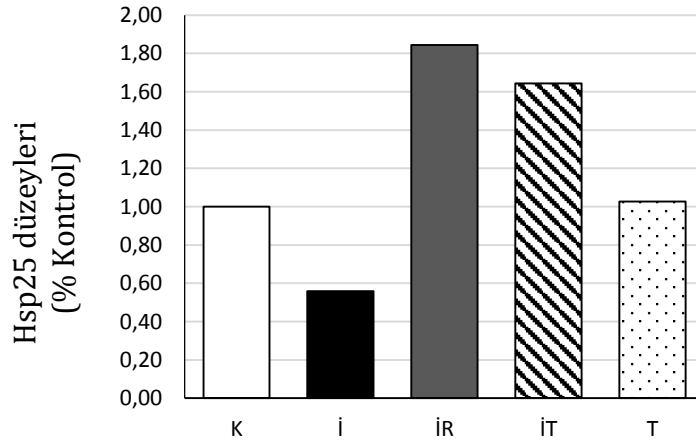
Tablo 4.32’de tüm grupların Hsp25 optik dansite karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 4.32. Tüm grupların Hsp25 optik dansite karşılaştırmaları.

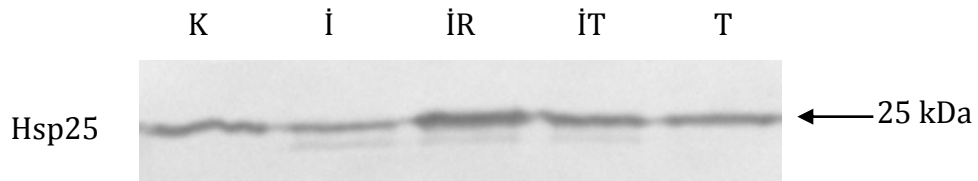
Gruplar	Optik Dansite (% Kontrol)				
	K	İ	İR	İT	T
K		$p= 0,162$	$p= 0,001$	$p= 0,017$	$p= 1,000$
İ			$p= 0,001$	$p= 0,001$	$p= 0,124$
İR				$p= 0,820$	$p= 0,002$
İT					$p= 0,024$
T					

Tablo 4.32’de verilen Hsp25 grup karşılaştırmalarında, İR ve İT gruplarında Hsp25 düzeylerinin K grubuna göre anlamlı olarak arttığı görülmektedir. Aynı zamanda bu gruplardaki Hsp25 düzeyleri İ grubuna göre de yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). İmmobilizasyon ve TVT’nin Hsp25 protein düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.34’te verilmiştir.

Şekil 4.34' de immobilizasyon ve TVT'nin Hsp25 protein düzeyleri üzerine etkisi verilmiştir.



Şekil 4.34. İmmobilizasyon ve TVT'nin Hsp25 protein düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 4.35. Hsp25 Western Blot görüntüleri.

5. TARTIŞMA

İskelet kası atrofisi; immobilizasyon, denervasyon, periferik sinirde oluşan parsiyel veya total zedelenme, spinal kord yaralanması yüksüzleştirme gibi kullanmama koşulları yanı sıra yaşlanma, açlık veya malnutrüsyon ya da kanser kaşeksisi, böbrek ve kalp yetmezliği, diyabet, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi çeşitli hastalık ve patolojik koşullarda kas kitle ve kuvvet kaybı ile karakterize bir durumdur. Atrofi, uzun süreli yatak istirahatini gerektiren durumlarda ağırlıklı olarak vücut ağırlığını taşıyan bacak kaslarında olmak üzere inaktif iskelet kaslarının tamamını etkilerken, alçı veya atel yoluyla ilgili ekstremitenin immobilizasyonunu gerektiren spor yaralanmaları ya da diğer çeşitli travmatolojik yaralanmalarda, ilgili ekstremitede kasılmaya iştirak etmeyen kaslarda görülür. Atrofiye neden olan koşula bağlı olarak uyarılan sinyal yolları ve moleküler mekanizmalar farklılık gösterse de, nedeni ne olursa olsun ortaya çıkan sonuç, iskelet kası atrofisi kas protein içeriği, lif çapı, kuvvet üretimi ve yorgunluğa dirençte azalmadır.

Kullanmamaya bağlı atrofi; yaş, lif tipi kompozisyonu, fizyolojik fonksiyon düzeyi, yüksüzlük veya inaktivitenin derecesine bağlı olarak farklılık gösterir (16). Plaster veya alçı yoluyla ayak bileği immobilizasyonu, kuyruktan asma, yüksüzleştirme, inaktivite ve spinal kord izolasyonu gibi çeşitli modeller, kullanmamaya bağlı kas kaybının moleküler mekanizmalarının aydınlatılması konusunda önemli bilgiler sunmuştur. Diğer yandan kullanmama modeli ve bu uygulamanın süresi ile değerlendirilen remobilizasyon süresi çalışmalar arasında farklılık gösterebilmektedir. Alçı veya atel yoluyla oluşan immobilizasyon gerek spor yaralanmalarında ve gerekse diğer ortopedik yaralanmalar sonrasında sıklıkla başvurulan bir uygulamadır. Bu çalışmada da kullanmama iki haftalık bilateral alçı uygulaması ile gerçekleştirilmiş olup remobilizasyon süresi ise bir hafta tutulmuştur.

Kas boyutu, kas hücrelerinde protein sentezi ve degradasyonu arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengede, sentezin azalması veya yıkımın artması atrofiye yol açarken, yıkımın azalması veya sentezin artması hiperofiyeye yol açar. Kullanmama sürecinde ortaya çıkan kas protein kaybında içerilen moleküler mekanizmaların aydınlatılması, çeşitli hastalıklar ve çevresel koşullar nedeniyle oluşan kas kitle

ve kuvvet kaybının önlenmesi yanı sıra, oluşan kayıpların daha doğru ve hızlı bir şekilde tedavi ve rehabilitasyonu için yöntemler geliştirilmesi açısından da önem taşımaktadır.

İskelet kası protein sentezi ve degradasyonu çok sayıda molekülün birbiri ile etkileşim içerisinde rol aldığı çeşitli sinyal yollarının kompleks bir iş birliği ile gerçekleşir. İskelet kası protein regülasyonunda yer alan iki temel sinyal yolağından birisi, pozitif rol oynayan IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR yolağı, diğeri ise negatif düzenleyici olan myostatin-Smad2/3 yolağıdır. Protein sentez ve yıkım yollarında rol alan moleküllerin birçoğu karşılıklı etkileşim halinde olup aktive olduklarında bir yandan aşağı akımda yer alan sinyal molekülünü uyarırken buna zıt işlev gören bir diğeri kilit molekülü de inhibe eder. Bu yollarda yer alan moleküllerin bazıları ana düzenleyici konumundadır ve aktivasyonları yolağın genel aktivasyonu konusunda bilgi verir. Bunların içerisinde Akt, mTOR ve daha sonraki basamaklarda rol alan 4E-BP1 ve p70S6K üzerinden protein sentezini uyarırken, FoxO transkripsiyon faktörü aracılığı ile de protein degradasyonunu kontrol eder. Öyle ki, aktive Akt FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu engeller (57). Böylece MuRF1 ve atrogin-1/MAFbx ekspresyonu inhibe olur (4). Negatif düzenleyici yolak olan miyostatin-Smad2/3 yolağı protein degradasyonundan sorumludur. mTOR bir yandan miyostatin yolağındaki Smad2'yi baskılayarak degradasyona engel olurken, diğeri yandan da 4E-BP1'i fosforile ederek bağlandığı eIF4E üzerindeki inhibisyonu kaldırarak protein sentezini hızlandırır. Akt tarafından mTOR'un uyarılması protein sentezini uyarırken, AMPK'nin mTOR aktivitesini inhibe ederek kas hipertrofisini önlediği bildirilmiştir (172). Bu çalışmanın önemli bir özelliği, gerek sentez ve gerekse yıkımda rol oynayan ve birbiri ile etkileşim içerisinde olan moleküllerin aynı çalışmada birlikte değerlendirilmiş olmasıdır.

Özellikle spor yaralanmaları olmak üzere ortopedik problemleri takiben alçı veya atel yoluyla gerçekleştirilen immobilizasyonun amacı, ilgili ekstremitenin hareketini engelleyerek doku iyileşmesine fırsat tanımadır. Ancak immobilizasyon bir diğeri önemli sorun olarak kullanılmayan kaslarda atrofiye neden olur. Kas, remobilizasyonun başlaması ile birlikte fizyolojik fonksiyonlarına geri dönmesine rağmen, meydana gelen kitle ve kuvvet kaybı

nedeniyle immobilizasyon öncesi sergilediği performansı ortaya koyamaz. Sonuç olarak remobilizasyon dönemi aynı zamanda, atrofinin iyileştirilmesi sürecidir ve bu dönemde immobilizasyondan farklı moleküler mekanizmaların devreye girmesi söz konusudur. Bu nedenlerle immobilizasyon sürecinde rol oynayan moleküler mekanizmalar yanı sıra alçı sonrası remobilizasyon sürecinde devreye giren mekanizmaların da incelenmesi, atrofinin iskelet kasında yol açtığı sorunların giderilmesine yönelik tedavi modalitelerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu çerçevede son yıllarda oldukça sık rastlanan TVT uygulamasının remobilizasyon dönemindeki etkinliği de merak konusudur. Bu çalışma, immobilizasyon ve TVT uygulamasının iskelet kası atrofi ve hipertrofi yolaklarında rol oynayan moleküller üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, immobilizasyon sonrası bir haftalık remobilizasyon sürecinde bu moleküllerin gen ekspresyonu ve protein düzeylerinin nasıl değiştiği ve remobilizasyon döneminde TVT uygulamasının bu değişimi moleküler düzeyde nasıl etkilediği de değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada; kontrol (K) , immobilizasyon (İ) , immobilizasyon sonrası bir haftalık remobilizasyon (İR) veya immobilizasyon sonrası remobilizasyon döneminde bir haftalık TVT'ye tabi tutulan sıçanlar (İT) ile sadece bir hafta TVT'ye tabi tutulan sıçanların soleus kasında; miyostatin, MuRF1, MAFbx, FoxO3a, FoxO1, mTOR, Akt1, p70S6K ve AMPK gen ekspresyonları değerlendirilmiş, ayrıca AMPK, fosforile AMPK, p-4EBP1, MuRF1, atrogen-1/MAFBx, pFoxO3, mTOR, pAkt1 ile Hsp72 ve Hsp25 protein düzeyleri incelenmiştir.

Çalışmanın sonuçları immobilizasyon, remobilizasyonun ve TVT uygulamasının mRNA ekspresyonunda çeşitli değişiklikler ortaya koymasına karşın, değerlendirilen genler arasında gruplar arasında anlamlı bir fark sadece MuRF1'de görülmüştür. Buna göre her üç immobilizasyon grubunda da MuRF1 mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Diğer ubiquitin ligaz (E3 ligaz) olan atrogen1/MAFBx açısından ise gruplar arasında mRNA ekspresyonunda anlamlı bir farkın bulunmadığı görülmüştür. Her ne kadar FoxO1 gen ekspresyonu immobilizasyon grubunda 1,8 kat artmış olsa da bu fark

istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Protein sentez ve yıkımında rol oynayan moleküllerin protein düzeyleri incelendiğinde durum biraz farklıdır. MAFbx ve MuRF1, FoxO transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenen, kasa spesifik ubikülin ligazlar olup ubikülin-proteozom sistem üzerinden protein degradasyonunu gerçekleştirirler. Bu çalışmada immobilizasyon grubundaki MAFbx ve MuRF1 protein düzeyleri K ve İT grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Ayrıca İR grubunda MuRF1 düzeyleri TVT grubundan daha yüksektir ($p < 0,05$). Bu bulgular hipotezimizin desteklendiğini göstermektedir.

FoxO3a'nın fosforile olması çekirdek translokasyonunu engeller. Böylece MAFbx ve MuRF1 transkripsiyonu inhibe olur. Molekülün defosforile formu ise çekirdeğe geçerek MAFbx ve MuRF1 transkripsiyonunu sağlar. Bu çalışmada fosforile FoxO3a protein düzeyi tüm immobilizasyon gruplarında anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu bulgu, iki haftalık alçılama yolu ile oluşturulan immobilizasyonun soleus kasında FoxO3a'nın fosforilasyonunun azalmasına neden olduğunun göstergesidir ve hipotezimizi desteklemektedir.

Bu çalışmada pAMPK/AMPK oranı immobilizasyon grubunda gerek kontrol ve gerekse immobilizasyon sonrası titreşim grubundan anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). AMPK fosforilasyonunun FoxO3'ün transkripsiyonel aktivasyonunu arttırdığı düşünüldüğünde bu bulgular hipotezimizin desteklenmediğini göstermektedir ve AMPK'nin metabolik fonksiyonları ile birlikte tartışılmasında yarar vardır.

Grupların p-4EBP1 düzeyleri incelendiğinde, immobilizasyon grubunda protein miktarının kontrol ve titreşim grubuna göre $p < 0,001$ anlamlılık düzeyinde, immobilizasyon sonrası remobilizasyon ve immobilizasyon sonrası titreşim grubuna göre ise $P < 0,05$ düzeyinde azaldığı görülmektedir. Ayrıca İR grubu kontrol ve titreşim grubundan, İT grubu ise sadece kontrol grubundan anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Bu bulgular protein sentezinde mTOR tarafından uyarılan aşağı akım sinyal molekülünün miktarının alçı yoluyla immobilizasyon yapılan grupta önemli ölçüde azaldığını göstermektedir ($p < 0,05$). Bu bulgular hipotezimizin desteklendiğini göstermektedir.

mTOR, protein sentezinde ana regülatör olarak rol alır. mTOR düzeyleri immobilizasyon grubunda kontrol grubu ve İR grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). mTOR'un yukarı akım molekülü olan ve fosforilasyonu ile aktive olarak mTOR'u uyaran p-Akt1 düzeyleri ise immobilizasyon grubunda diğer grupların tamamından düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Hipotezimizi destekleyen bu bulgu, literatürde farklı sürelerde uygulanan immobilizasyon modellerinde fosforilasyonunun azaldığı bildirilen Akt'nin bu çalışmada uygulanan iki haftalık immobilizasyon sonunda da azaldığını göstermiştir.

Hsp72 düzeyleri immobilizasyon grubunda, İT grubu dışındaki diğer tüm gruplarından düşüktür ($p<0,01$ - $p<0,001$). İR grubunda Hsp72 düzeylerinin kontrol seviyelerine olduğu görülmüştür ($p>0,05$). İT grubunun Hsp72 düzeyleri ise İR ve kontrol grubunun gerisinde kalmıştır ($p<0,05$). Bu bulgular hipotezimizin desteklendiğini göstermektedir.

Son olarak immobilizasyon grubunda Hsp25 düzeyleri azalmakla birlikte kontrol grubundan farklı değildir ($p>0,05$). İT ve İR gruplarında Hsp25 seviyeleri artmış olup, immobilizasyon, kontrol ve TVT gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bulgular hipotezimizin kısmen desteklendiğini göstermektedir.

Yukarıda kısaca özetlenmiş olan çalışma bulguları aşağıda ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

5.1. Deneysel desenin eleştirisi:

Bu çalışmada 30 adet 4 aylık wistar cinsi sıçan beş gruba ayrılmıştır. Alçılama yoluyla oluşan immobilizasyon etkisinin değerlendirilebilmesi için 2 haftalık immobilizasyonun sonunda bu gruptaki hayvanlar (İ), kontrol (K) grubundaki hayvanlarla birlikte ötenazi edilerek soleus kası izole edilmiştir. İmmobilizasyon sonrası remobilizasyonun etkisinin değerlendirilebilmesi amacı ile bir grup sıçan iki haftalık immobilizasyon sonunda bir hafta boyunca remobilize edilmiştir (İR). Böylece, immobilizasyon sonrasında bir haftalık remobilizasyonun ne gibi bir değişikliğe yol açtığı değerlendirilebilmiştir. Bu çalışmada kullanılan diğer iki grup ise tüm vücut titreşimi (TVT)'nin uygulandığı gruplardır. Bunlardan birincisi iki haftalık immobilizasyonu takiben

remobilizasyon sürecinde bir hafta TVT uygulanan hayvanlardır (İT). Son grup ise sadece bir hafta TVT uygulanan gruptur (T). Böylece TVT uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doğrudan bir haftalık TVT'nin etkisinin değerlendirilebilmesi mümkün olmuşken, İT grubunun İR grubu ile karşılaştırılması, immobilizasyon sonrasında sıçanların sadece remobilize edilmesi ile remobilizasyona TVT'nin eklenmesinin toparlanma döneminde moleküler mekanizmaları nasıl etkilediği sorusu da cevaplandırılabilmiştir.

Kullanmamaya bağlı atrofi; kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme, sinerjist kasın temotomisi, alçı, atel veya klips yoluyla ilgili ekstremitenin immobilizasyonu gibi çeşitli hayvan deneyleri ile gerçekleştirilmektedir. Özellikle alçı veya atel yoluyla belirli bir süre immobilizasyonun zorunlu olduğu spor yaralanmaları ve diğer ortopedik problemlerde geriye dönüşün hızlandırılması ekonomik ve sosyal açıdan ciddi bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada özellikle alçı yoluyla immobilizasyon yapılması tercih edilmiştir.

Kas boyunun kılmasını sağlayacak şekilde immobilizasyon yapılması liflerde sarkomerlerin kaybına neden olurken, uzatılmış şekilde yapılan immobilizasyonun lif ucuna sarkomer eklenmesini ve longitudinal bir uzama sağlayacağı bildirilmiştir. Ayrıca kronik germenin, kas lifinde sarkomerin enine eklenmesi yoluyla kas kesit alanında da büyümeye yol açacağı ifade edilmiştir (132). Bunun tersi olan kasta kronik kılma lif atrofisine neden olur (9). Bu çalışmada soleus kasında atrofi oluşturmak için alçılama ayak bileği plantar fleksiyon pozisyonunda gerçekleştirilmiştir. Nitekim çalışmanın sonuçları iki haftalık immobilizasyonun sıçan soleus kasında %37 düzeyinde bir kas kitlesi azalması ile sonuçlandığını göstermektedir.

Bu çalışmada bilateral alçılama uygulanmıştır. Bu şekilde yapılan alçılama her iki bacağın belden aşağı immobilizasyonu söz konusu olduğu için sıçan vücut ağırlığının önemli bir kısmını oluşturan kaslarında da atrofi söz konusudur. Her ne kadar soleus kas ağırlığının vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen değerler verilse de, büyük kasların atrofisinden kaynaklanabilecek vücut ağırlığı kaybı soleus kasındaki atrofisinin daha az görülmesine yol açacaktır. Bu durum özellikle immobilizasyon yapılan gruplar için geçerlidir. Bu nedenlerle,

literatürdeki örneklerinde görüldüğü gibi soleus kas ağırlıkları üzerinden de sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Yaşlanma, immobilizasyonla oluşan atrofinin daha dramatik olarak ortaya çıkmasına neden olur. Bu çalışmada 4 aylık Wistar sıçanlar kullanılmış olup yaşlanmanın etkisi değerlendirilmemiştir.

İmmobilizasyon, iskelet kası kapillerizasyonunda azalma, konnektif dokuda artma ve kas lif çapı küçülmesi ile karakterize histokimyasal değişikliklere yol açar. Bu çalışmada iskelet kası, histokimyasal özellikleri veya hasar belirteçleri açısından da değerlendirilmeyip bir tedavi modalitesi olarak TVT'nin etkinliği yalnızca moleküler mekanizmalar açısından araştırılmıştır.

TVT'nin insanda 20-40Hz frekans ve 1-5mm genlik, sıçanda ise 17-90Hz ve 0,1-3mm genlikte uygulandığında kas kasılmasını uyaran bir özelliği olduğu belirtilmiştir (157). TVT ve sıçan çalışmaları sınırlı olup bu çalışmada sıçanlarda 45Hz frekansta 3mm genlikte uygulanmıştır. Bu değerlerin seçilmesinde gerim refleksinin daha iyi uyarılabilmesi için genlik maksimum seçilirken frekans için ortalama bir değer tercih edilmiştir.

5.2. Soleus kası atrofi:

Bu çalışmada immobilizasyon gruplarının tümünde (İ, İR ve İT) soleus kası ağırlıkları kontrol grubuna göre azalmıştır ($p < 0,05$). Immobilizasyon sırasında kas ağırlığının azalmasının nedeninin kas su içeriğinde bir değişmeden kaynaklanmadığı ve kas kuru ağırlığının yaş ağırlığa oranının tek taraflı immobilizasyon sonrası kontrol bacağına göre bir değişiklik göstermediği bildirilmiştir (160) Bu nedenle kas ağırlığında oluşan değişikliklerin aynı oranda kassal proteinlerde azalmanın da bir göstergesi olduğu düşünülmektedir.

İmmobilizasyonu takip eden bir haftalık remobilizasyon ve remobilizasyonla birlikte TVT uygulamasının soleus kas ağırlığını anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer yandan İT grubundaki artış İR grubunun gerisinde kalmıştır ($p < 0,05$). Diğer bir ifade ile TVT nin kas kitlesinin arttırılmasında etkili olmadığı görülmüştür. Nitekim TVT grubunda soleus ağırlığında kontrol grubuna göre bir artış söz konusu değildir ($p > 0,05$). Soleus kasının vücut ağırlığına oranı açısından değerlendirecek olursak sadece

immobilizasyon grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir düşüş vardır ($p<0,05$). Bu sonuçlar iki haftalık immobilizasyonun soleus kası atrofisine yol açtığını göstermektedir. Çalışmada uygulanan bilateral alçının sıçan iskelet kaslarının önemli bir kısmında atrofiye yol açacağı düşünüldüğünden atrofinin soleus kas ağırlığının vücut ağırlığına bölünerek hesaplanması özellikle immobilizasyon yapılan gruplarda uygun olmayacaktır. Nitekim alçı sonrası immobilizasyon grubundaki sıçanların vücut ağırlığının önemli ölçüde azalması ($p<0,05$) ve immobilizasyonu takip eden bir haftalık remobilizasyon sürecinde gerek İR ve gerekse İT grubunda vücut ağırlığının önemli ölçüde artmış olması da ($p<0,05$) bunu desteklemektedir.

Kannus ve diğ (1998) sıçanlarda, 3 haftalık tek bacak immobilizasyonu sonrasında 8 haftalık remobilizasyon grubu ile 8 haftalık remobilizasyonun son 7 haftasını düşük veya yüksek şiddette treadmill koşusu ile tamamlandığı grupları karşılaştırmıştır. Immobilizasyon sonrasında, kapillerizasyonda azalma, konnektif dokuda artma ve kas lif çapı küçülmesi ile karakterize histokimyasal değişikliklerin toparlandığını ve yüksek şiddetli egzersizlerin bu toparlanmada daha etkin olduğu görülmüştür (84). Bu doktora çalışmasında kas kuvvet artışına yol açtığı belirtilen TVT'nin kas kitle artışında etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçlar TVT'nin soleus kası ağırlığında bir artışı sağlamadığını göstermiştir.

Booth (1978), 28 gün alçı sonrasında gastroknemius kas ağırlığının remobilizasyonun ancak 50. gününde eski düzeylerine döndüğünü göstermiştir (24). Maeda ve diğ (1993), kas ve kemik dokusunun tam bir toparlanma için immobilizasyondan daha uzun bir remobilizasyon sürecine ihtiyacı olduğunu bildirmiştir (114). Bununla birlikte farklı bulgular da yok değildir. Örneğin 90 günlük immobilizasyonu takiben 14 günlük remobilizasyonun soleus kası ağırlığının eski duruma gelmesi için yeterli olduğu bildirilmiştir (27). Ancak bu çalışmada da maksimal izometrik gerim 120. günde başlangıç düzeylerine ulaşmıştır. Bu çalışmalar immobilizasyon sonrası kasın eski kitle ve fonksiyonuna dönme sürecinde tek başına remobilizasyonun yeterli olmadığını ve ilave tedavi ve rehabilitasyon modalitelerinin geliştirilmesinin gerekliliğini göstermektedir.

İmmobilizasyonla oluşan kas içi konnektif doku artışı, kapillerizasyonda azalma, lif çapında küçülme ve lif tipi değişimi gibi hücresel değişikliklerin daha sonraki remobilizasyon sürecinde kolayca geri dönmediği bilinmektedir. Remobilizasyon döneminde iyileşme sürecini hızlandırmak için, büyüme hormonları (32, 60, 204), testosteron (59), düşük ve yüksek şiddetli egzersiz (84), aralıklı ve kısa süreli germe egzersizleri (200) gibi uygulamaların etkinliğini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yaşlı sıçanlarda büyüme hormonunun immobilizasyonla oluşan plantaris kas kaybını ve kas hasarını önemli ölçüde azalttığı, protein karbonil miktarlarını da düşürdüğü gösterilmiştir (32, 60). Dört hafta eksternal fiksasyon yoluyla tek bacakta immobilizasyon oluşturulan 24 aylık sıçanlarda kas ağırlığı %32-42 arasında düşerken, immobilizasyonu takiben 4 haftalık remobilizasyonla kas ağırlığı ve asit fosfataz aktivitesinin remobilizasyon döneminde geriye dönmediği ve sadece kas morfolojisinde kısmi bir iyileşme sağlandığı görülmüştür (204). Aynı çalışmada, 6 aylık sıçanlarda dört haftalık remobilizasyonun belirgin bir iyileşme gösterdiği ve kas morfolojik yapısının hemen hemen başlangıç düzeylerinde döndüğü belirtilmiştir (204). Yaşlının kullanmama atrofisine daha dramatik yanıt verdiği görülmektedir. Bu doktora çalışmasında yaşlanmanın etkisi araştırılmamış olup, bir haftalık remobilizasyon sürecinde kas ağırlığı hızla yükselmesine karşın kontrol düzeylerine gelmemiştir. Keza 45Hz ve 3mm genlikte TVT uygulamasının kas kitlesini artırmak veya atrofi önlemek açısından etkin bir modalite olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Bir gün içerisinde 30 dakikalık kısa süreli germenin kas kitlesini koruduğu (200) ve 4 haftalık immobilizasyon sonunda remobilizasyon sürecinde yapılan kısa süreli germe egzersizlerinin birinci haftanın sonunda sadece remobilizasyona göre tip I lifleri enine kesit alanı açısından bir avantaj sağladığını, üçüncü haftanın sonunda ise germe grubunda hem tip I hem de tip II lifleri kesit alanında belirgin bir iyileşmenin gözlemlendiğini belirtilmiştir (81). Bu çalışmada kas lifi kesit alanı değerlendirilmemiş olup bu konuda bir yorum yapılamamıştır. Diğer yandan TVT'nin kas igciklerinde gerim reflekslerini aktive ettiği bildirilmektedir. Kuşkusuz TVT'deki 45Hz frekanslı uyarı ile ortaya çıkan ve kas içiğini aktive ettiği bildirilen gerim, Williams ve diğerlerinin uyguladıkları

ve kasın boyunun 30 dakika boyunca uzun tutulduğu gerimden farklıdır. Sonuç olarak bu doktora çalışmasında uygulanan TVT, en azından kas kitlesinin geri dönüşü açısından bir avantaj sağlamamıştır.

5.3. FoxO, MAFbx ve MuRF1 Bulguları

IGF-1 iskelet kasında görev alan anabolik yollar için son derece önemli bir düzenleyicidir. IGF-1'in hücre zarı reseptörüne bağlandıktan sonra PI3K'yi aktive eder ve aktive PI3K tarafından fosforillenen Akt, bu yolağın diğer bir elemanı olan mTOR'u aktifleştirir ve böylece protein sentez hızı artar.

Bu çalışmada IGF1-PI3K-Akt-mTOR sinyal yolağında rol alan moleküllerden Akt1, mTOR ve p70S6K gen ekspresyonları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her ne kadar FoxO1a mRNA seviyeleri I grubunda 1,8 kat artış görülse de, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Ayrıca, FoxO3 ve MAFbx mRNA seviyelerinde de gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Diğer yandan, MuRF1 gen ekspresyonu immobilizasyon gruplarının tümünde, beklenenin aksine azalmıştır ($p<0,05$).

MuRF1, MAFbx ile birlikte FoxO transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenen kasa spesifik bir ubiquitin ligazdır. Hücre kültüründe MAFbx düzeyleri ile protein degradasyonunun bire bir örtüştüğü bildirilmiştir (165). MAFbx ve MuRF1 ekspresyonlarının, farklı atrofi modellerinde ubiquitin-proteozom sistem üzerinden protein degradasyonunu gerçekleştirmek üzere arttığı bilinmektedir (105). Atrogin-1/MAFbx veya MuRF1 geninden yoksun farelerde, denervasyon ile oluşturulan atrofideki gerilemenin bu genlerin kullanmama atrofisindeki rolünün de göstergesidir (17). Bu çerçevede, immobilizasyon ve denervasyon ile oluşan kullanmamaya bağlı atrofi modellerinin iskelet kasında MuRF1 ve atrogin-1/MAFbx ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (18). Bu modellerden beş gün kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirmenin uygulandığı sıçan soleus kasında MuRF1 düzeylerinde artış olduğunu bildirmiştir (203). Keller ve diğerleri (2014) sıçanlarda üç gün boyunca kısalmış durumda immobilize edilen soleus kasında MAFbx ve MuRF1 gen ekspresyonunun arttığını (87), kas gerilmiş durumda immobilizasyon yapıldığında görülmemiştir (132). Bu doktora çalışmasında alçı uygulaması soleus kası plantar fleksiyon pozisyonunda yapılmıştır. Sonuç olarak

soleus kısalmış durumda yapılan iki haftalık immobilizasyon kas atrofisine neden olmuştur (soleus ağırlığı veya soleus/vücut ağırlığı). Diğer yandan çalışma, immobilizasyon sürecinde MuRF1 gen ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Atrofi sırasında artması beklenen MuRF1 gen ekspresyonundaki azalma literatür ile çelişkili gibi görünmektedir. Bununla birlikte, sonuçların yorumlanmasında çalışmalar arasındaki farklı noktaların gözden geçirilmesinde yarar vardır.

Öncelikle bu doktora çalışmasında uygulanan immobilizasyon süresi iki hafta olup yukarıda söz edilen ve MAFbx ile MuRF1 gen ekspresyonlarının arttığını gösteren çalışmalardan daha uzundur. Çalışmalar, gerek insan ve gerekse hayvan modellerinde kullanmama süresinin uzaması ile MAFbx ve MuRF1 mRNA düzeylerindeki artışın geriye döndüğünü göstermektedir. Nedergaard ve diğ (2012) insan deneklerde, ayak bileği 90 derecede nötral pozisyonda iken yaptıkları iki haftalık alçı sonunda medial gastroknemius kasından aldıkları biyopsi örneğinde Akt, mTOR, Atrogin-1 and MURF1 mRNA ekspresyonunda bir değişiklik bulamamış, FOXO3 gen ekspresyonunda ise hipotezlerinin tersine azalma ($p < 0,05$) bulmuşlardır (133). deBoer ve diğ (2007), insan deneklerde 10 günlük immobilizasyon sonunda MuRF1 mRNA seviyelerinde artış gözlerken, 21 günün sonunda tam tersi bir azalma görmüşlerdir. MAFbx gen ekspresyonu ise 10. günde anlamlı bir artış göstermezken 21. gün anlamlı ölçüde azalmıştır (49). Abadi ve diğerleri (2009) insan deneklerde uyguladıkları 2 haftalık unilateral immobilizasyonun 48. saatinde MAFbx ve MuRF1 mRNA seviyelerinin arttığını, 14. günde ise başlangıç seviyelerine döndüğünü gözlemişlerdir (1). Sıçan çalışmalarını incelediğimizde ise, Krawiec ve diğerleri (2005) tek taraflı olarak arka bacağı 1, 3 ve 5 gün boyunca alçıya aldıkları çalışmada gastroknemius yaş ağırlığının 3. günde %12 azaldığını ancak 5. günde değişmediğini bildirmiştir. Beşinci günde protein sentezi ve translasyonun verimliliğinde ve translasyonda rol alan düzenleyici proteinlerin fosforilasyonunda da bir değişiklik saptanmamıştır. Bu çalışmada MAFbx ve MuRF1 mRNA içeriğinin her üç dönemde de arttığı ancak pik değer 3. günde elde edildiği görülmüştür (93). Scheck ve diğ (2007), sıçanlarda denervasyon veya spinal kord izolasyonu yoluyla 1, 3, 14 ve 28 gün zaman aralıklarında atrofiyi değerlendirdikleri çalışmada 3. gün kas kaybı hızının en

yüksek olduğunu ve MAFbx gen ekspresyonunun yaklaşık 50, MuRF1 gen ekspresyonunun ise yaklaşık 20 kat arttığını göstermiştir. Bu çalışmada atrofinin 14. günde yavaşladığı ve sonraki iki haftada ise denervasyon modelinde azalarak devam ederken spinal kord izolasyonunda tamamen ortadan kalktığı görülmüştür. Benzer şekilde her iki atrogenin gen ekspresyonu artışının 14. günde %92 oranında düşüş gösterdiği de ifade edilmiştir (164).

Sonuç olarak çalışmalar, kas atrofisinin MAFbx ve MuRF1 genleri ekspresyonundaki artışı takiben meydana geldiği (69, 165) ve kullanmama sürecinin erken dönemlerinde bu genlerin aktivasyonunun ciddi ölçüde arttığını göstermektedir (164, 203, 93). İnsanda 10 günün üzerindeki immobilizasyonlarda MAFbx ve MuRF1 genlerinin baskılandığını, hayvan çalışmalarında da iki haftalık sürenin bu genlerdeki artışı ortadan kaldırdığı görülmektedir.

Nitekim bu tez çalışmasında da iki haftalık immobilizasyon soleus kasında atrofiye yol açmıştır. Çalışmada immobilizasyon sonunda MAFbx düzeylerinde bir değişiklik olmayışı veya atrogen1/MuRF1 mRNA düzeylerinin düşük bulunuşu, erken dönemde bu genlerin ekspresyonunun artarak hızlı kas atrofisini oluşturduğu, ilerleyen dönemde ise artmış atrogen1/MuRF1 ve MAFbx seviyelerinin bazal düzeylere indiği ve ikinci haftanın sonuna gelindiğinde ise düzeylerinin daha da düşmüş olduğu ihtimalini düşündürmektedir. Hatta bu MuRF1 mRNA için bu düşüş azalmayla sonuçlanmıştır. Nitekim MAFbx ve atrogen1/MuRF1 protein düzeylerinin immobilizasyon grubunda yüksek bulunuşu da bu yorumumuzu desteklemektedir.

TVT'nin etkisi açısından değerlendirdiğimizde ise T grubunda söz konusu olan atrogenlerin gen ekspresyonu veya protein düzeylerinde bir farklılık görülmemiştir. Benzer şekilde immobilizasyonu takiben remobilizasyon sürecinde TVT'nin varlığı herhangi bir fark yaratmamış, hem MuRF1 hem de atrogen1/MAFbx mRNA veya protein düzeyleri İT ve İR gruplarında farklı bulunmamıştır.

Bu çalışmada FoxO1 mRNA düzeyleri immobilizasyon sonunda 1,8 kat artmış olmasına karşın bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). FoxO'ların atrogen1/MuRF1 ve MAFbx üzerinden kas atrofisini gerçekleştirdiği

düşünüldüğünde, FoxO1 gen ekspresyonunda immobilizasyonun erken dönemlerinde artmış olabileceğini iddia etmek yanlış olmaz. İki haftanın sonunda ise bu artışın bir miktar düşmüş olduğu tahmin edilmektedir. Sacheck ve diğerleri (2007), atrojenlerin ekspresyonunun bifazik bir doğası olduğunu ve bu genlerin seviyesinde erken dönemde görülen artışları takiben bazal düzeye geri dönüldüğünü ve sonrasında da bir düşüşün olacağını bildirilmiş ve bu nedenlerle immobilizasyonun daha ileri dönemlerinde incelenmesinin erken dönemde oluşan değişikliklerin görülemesini engelleyeceğine dikkat çekmiştir (164).

Bu çalışmada FoxO, MAFbx ve MuRF1'in protein ekspresyonlarına da bakılmış olması sonuçları daha doğru yorumlamamıza yardımcı olmaktadır. Nitekim iki haftalık alçı sonrası fosforile FoxO3a protein düzeyleri azalmış, MAFbx ve MuRF1 protein ekspresyonu ise artmıştır ($p < 0,05$). FoxO3a'nın fosforilasyonu, onun çekirdeğe girmesini engelleyerek MAFbx ve MuRF1 ativasyonunu inhibe etmektedir. Bu çalışmada immobilizasyon grubunda görülen p-FoxO3a düzeylerinin azalışı MAFbx ve MuRF1 protein düzeylerindeki artışı açıklamaktadır.

Çalışmada fosforile FoxO3a düzeyleri diğer iki immobilizasyon grubunda da kontrol grubundan düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu durum alçı gruplarının üçünde de FoxO3a fosforilasyonunun azaldığı, dolayısıyla transkripsiyonel aktivitesinin arttığını göstermektedir. Diğer yandan, Sacheck ve diğerleri (2007) FoxO1 mRNA düzeylerinin kullanmamanın erken dönemlerinde görülen hızlı atrofi döneminde arttığı ve iki haftadan sonraki dönemde görülen yavaşlayan atrofi döneminde de yüksek kaldığı ancak bu dönemde MAFbx ve MuRF1 düzeyleri artmadığı için bunun atrojen ekspresyonu ile ilişkilendirilemediğini bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında remobilizasyon döneminde FoxO3a fosforilasyonu her üç immobilizasyon grubunda da kontrol grubuna göre daha az olmasına rağmen, İR ve İT gruplarında immobilizasyon grubundan yüksektir ($p < 0,05$). Diğer bir ifadeyle, remobilizasyon gruplarında FoxO3a fosforilasyonunun yükselmeye, dolayısıyla transkripsiyonel aktivitesinin azalmaya başladığı görülmektedir. Nitekim İR ve İT gruplarında MAFbx protein düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($p > 0,05$). Atrogin1/MuRF1 protein düzeyleri ise İR grubunda hala kontrol grubundan yüksektir ($p < 0,05$). İR ve İT

gruplarında, soleus/vücut ağırlığı veya soleus ağırlığı değerlerinin immobilizasyon grubundan daha yüksek olması da ($p<0,05$) protein ekspresyonu bulgularını desteklemektedir.

Remobilizasyona TVT'nin eklenmesi ile MAFbx ve atrogen1/MuRF1 protein düzeylerinde ortaya çıkan durum dikkat çekmektedir. Öyle ki, İR grubundan farklı olarak İT grubunda MAFbx düzeyleri İ grubunun gerisine düşmüştür ($p<0,05$). Keza atrogen1/MuRF1 protein düzeyleri İT grubunda İ grubundan farklı olmamakla birlikte K grubu değerlerine yaklaşmıştır ($p=0,076$). Bu bulgular, immobilizasyona TVT'nin eklenmesinin atrofi genlerinin protein düzeylerini azaltabileceğini düşündürmekte olup ileriki çalışmalarda değerlendirilmesi gereken bir konudur.

Sıçanlarda kuyruktan asma modelinde oluşan atrofide MuRF1 geni regülasyonunun FoxO değil NF κ B üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir (203). Bu çalışmada alçı yolu ile oluşturulan immobilizasyonda NF κ B'nin rolü değerlendirilmemiştir. Diğer yandan FoxO3a fosforilasyonu ile atrogen1/MuRF1 değil ama MAFbx protein ekspresyonu sonuçlarının birbirinin ayna görüntüsü vermiş olması da bu anlamda ilginç bulunmuştur.

5.4. Akt1, mTOR, 4EBP1 ve p70S6K bulguları

Bu çalışmada Akt1, mTOR ve p70S6K gen ekspresyonları ile mTOR, p-Akt1 ve p-4EBP1 protein düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışma mRNA düzeyi açısından gruplar arasında bir fark olmadığını gösterirken mTOR, p-Akt1 ve p-4EBP1 protein düzeylerinin immobilizasyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu bulgular immobilizasyonun protein sentezinde rol oynayan genlerin aktivitesini baskıladığını göstermekte olup hipotezimizi desteklemektedir.

IGF-1 yolağının iki elemanı Akt ve mTOR, kas hücresinde protein döngüsü açısından son derece kritik bir öneme sahiptir. mTOR, Akt'nin aşağı akımında yer alır ve Akt tarafından aktive edilir. Lai ve diğerleri (2004), yapısal olarak aktif Akt formuna sahip transgenik farelerde, Akt aktivasyonunun *in vivo* indüklenmesinin hipertrofiyi tetiklemede yeterli olduğunu ve bu aktivasyona sonraki basamaklarda yer alan p70S6K (p70S6 kinaz) aktivasyonunun da eşlik ettiğini

göstermişlerdir (98). mTOR, 70kDa ribosomal protein S6K1'i uyararak translasyonun artmasını sağlar. Diğer yandan, normal koşullarda 4EBP1 eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E)'e bağlanarak translasyonu engellemekte iken (18), mTOR'un 4EBP1'i fosforile etmesi ile eIF4E aktif hale gelir (64). Bodine ve diğerleri (2001b) ise, Akt/mTOR yolağının hipertrofide up-regüle, kullanılmamaya bağlı atrofide ise down-regüle olduğunu, dahası farklı hipertrofi modellerinde rapamisin ile bloke edilen mTOR'un kasta hipertrofiyi %95 oranında engellediğini göstermiştir (18).

Translasyonu kontrol eden bir diğer önemli sinyal molekülü olan ökaryotik elongasyon faktörü 2 (eEF2) ise, mTOR tarafından p70S6K üzerinden indirekt olarak regüle edilir (193). mTOR yolağının kasa etki eden yük arttığında hemen aktive olduğu ve toparlanma periyodunda bir saat içinde protein sentezini arttırdığı bildirilmiştir (22). Eğer direnç egzersizlerinden önce mTOR inhibe edilirse, protein sentezinin engellendiği gösterilmiştir (96).

Akt ve mTOR, farklı hücrel süreçler ile ilişkili olmaları açısından da iskelet kas protein döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Akt, mTOR aracılığı ile protein sentezini, FoxO transkripsiyon faktörleri aracılığı ile de protein degradasyonunu kontrol eder. mTOR ise, protein degradasyonundan sorumlu olan miyostatin yolağındaki Smad2'yi baskılayarak degradasyona engel olurken, aynı zamanda 4E-BP1 fosforilasyonunu düzenleyerek protein sentezini hızlandırır (57).

Bu çalışmada, immobilizasyon sonrası Akt1 ve mTOR düzeyleri ile fosforile 4E-BP1 düzeylerindeki azalma görülmüştür. Böylece protein sentezi ile ilgili yolların etkinliği azalmıştır. İmmobilizasyon grubunda fosforile FoxO3a'nın azalması ve MAFbx ile atrogen1/MuRF1'in artması ile birlikte bu bulgular protein yıkımının arttığı sentezinin ise azaldığının göstergesidir. Bu sonuçlar hipotezimizin kabul edilmesini sağlamıştır.

4EBP1, mTOR tarafından fosforile edilmekte olup fosforilasyon bu molekülün bağlı olduğu eIF4E'den ayrılmasını ve protein sentezini sağlar. Çalışmada p-4EBP1 düzeylerinin her iki remobilizasyon grubunda da anlamlı olarak artması (p<0,05) protein sentezi üzerindeki inhibisyonun remobilizasyon döneminde azalmaya başladığını göstermektedir. Nitekim p-Akt1 protein

değerleri İR ve İT grubunda İ grubundan anlamlı olarak yüksektir (p=0,001). mTOR değerleri incelendiğinde, immobilizasyon grubu ile karşılaştırıldığında İR grubu protein düzeylerinin anlamlı olarak yüksek (p=0,004), İT grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek (p=0,061) bulunmuştur. Remobilizasyon döneminde TVT'nin eklenmesinin protein sentezine ilişkin moleküllerin düzeyinde her hangi bir ilave etkiye neden olmamıştır.

Diğer yandan bu çalışmada TVT'nin Akt1 ve mTOR düzeyleri ile 4E-BP1 düzeylerinde bir artışa yol açmadığı görülmüştür. Bu bulgu hipotezimizin aksine, 45Hz ve 3mm genlikte bir hafta süre ile aralıklı TVT uygulamasının, kas protein sentezi artışına yol açan moleküller üzerine bir etkisi olmadığını göstermektedir.

5.5. Miyostatin-Smad2/3 Sinyal Yolağı

Kas gelişimini kontrol eden ikinci ana yolak, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) ailesinin bir üyesi olan miyostatin (GDF-8)'dir. Miyostatinin ActRIIB'ye bağlanması ile aktifleşen Smad2 ve Smad3, Akt fosforilasyonunu baskılar. Akt normal koşullarda protein sentezini korumak üzere FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu engeller. Bu transkripsiyon faktörleri aktif durumdayken, MuRF1 ve atrogin-1 olarak da adlandırılan MAFbx iskelet kasına spesifik iki ubiquitin ligazın ekspresyonunu sağlar. Akt'nin yeteri kadar fosforile olmaması, FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu engelleyemeyeceği için, FoxO aktivasyonu sürdürür ve MuRF1 ve MAFbx ekspresyonu artar (4). Böylece, bir yandan protein sentezinin azalması ve diğer yandan degradasyonun artması negatif bir protein yapım/yıkım dengesini beraberinde getirir.

Bu çalışmada miyostatin mRNA düzeylerinde bir değişiklik bulunmamış, Smad2/3 ve miyostatinin protein düzeyleri ise değerlendirilememiştir. Çalışmada immobilizasyon grubunda azalmış olan Akt1 fosforilasyonu mTOR aktivasyonunu engellmiş, FoxO3a'nın da inhibisyonu ortadan kalkmıştır. Dolayısıyla MuRF1 ile MAFbx düzeyleri artmış ve atrofi gerçekleşmiştir. p-Akt1 düzeylerinin azalmasında miyostatin-Smad2/3 yolağının etkinliği değerlendirilmediği için bir yorum yapılamamaktadır. Kasa spesifik miyostatin aşırı ekspresyonu sadece erkek farelerde ve %20 civarında kas atrofisi

oluşturmuştur (207). Yedi gün süreli kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme modelinde miyostatin geninden yoksun farelerin beklenenin aksine daha ciddi bir atrofi yanıtı verdikleri gösterilmiştir (121). On gün kuyruktan asma yoluyla yapılan yüksüzleştirme plantaris kas ağırlığında %16'lık azalma ve miyostatin mRNA düzeylerinde %110 ve miyostatin protein düzeyinde ise %37'lik artış göstermiştir. Diğer yandan, yüksüzlenmenin günde 30 dakika eksik yapılması kas miyostatin mRNA düzeylerinde %55 artışa neden olmuş, dolayısıyla miyostatin artışına rağmen atrofının büyük ölçüde engellendiği görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmalar miyostatinin varlığının atrofi için tek başına yeterli olmadığını (195) veya miyostatin seviyelerinde azalmanın atrofının engellenmesi için yeterli olmadığını göstermektedir. Bu çalışmalar immobilizasyon atrofisinde miyostatinin rolünün sınırlı olacağını düşündürmektedir.

5.6. AMPK düzeyleri ve İmmobilizasyon

Bu çalışmada elde edilen bir diğer bulgu da p-AMPK /AMPK düzeylerinin immobilizasyon grubunda azalmış olmasıdır. AMPK hücrenin enerji durumunu algılayan bir protein olup kas hücresi içerisinde AMP/ATP oranının artması, AMPK aktivasyonuna yol açar (154). AMPK aktivasyonu ATP'yi kullanan yolları inhibe ederek enerjinin korunmasını sağlar (75).

AMPK'nin iskelet kası hipertrofinde temel düzenleyici molekül olan mTOR'u inaktive ettiği ve dolayısıyla protein sentezinde doğrudan rol oynayan S6K1 aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Nitekim AMPK aktivatörü olan AICAR'ın mTOR aracılı sinyal yolağını ve iskelet kası protein sentezini gerek dinlenme (21) ve gerekse elektriksel uyarıya maruz bırakılan iskelet kasında inhibe ettiği bildirilmiştir (184). Krawiec ve diğ (2007), C2C12 hücrelerini farklı dozlardaki AICAR veya metformin ile 24 saat inkübe ettiklerinde, MAFbx ve MuRF1 mRNA'larının doza bağlı olarak arttığını ve AMPK inhibitörünün kültüre eklenmesinin ise, MAFbx ve MuRF1 mRNA'larındaki artışının engellendiğini bildirmiştir (94). Miyofibriler AMPK'nin enerji stresinde (yetersiz enerji) FoxO3'ü Akt'den farklı noktalardan fosforile ettiği ve transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (70, 71). Bu bulgular AMPK aktivasyonunun bir yandan

protein sentezini engelleyerek, diğer yandan da protein degradasyonunu uyararak protein kaybında rol oynayabileceğini göstermektedir.

Diğer yandan AMPK'nin tek başına atrofiden sorumlu bir molekül olmayıp temel görevi enerji düzeyini algılayarak bir yandan enerji harcamasını azaltmak diğer yandan da hücre içerisine glukoz alımı ve yağ oksidasyonunu arttırmak için gerekli düzenlemeleri yapmaktır (15, 142). AMPK bu görevi GLUT4 taşıyıcıları aktive ederek ve mitokondriye yağ asiti alımını engelleyen Malonil CoA düzeylerinin azalmasını sağlayarak gerçekleştirir. Denervasyon atrofisinde AMPK düzeylerinin azaldığı, AICAR verilmesinin gastroknemius kasında AMPK düzeylerini arttırırken soleus kasında arttırmadığı bildirilmiştir (201). Keza üç günlük AICAR tedavisinin denerve gastroknemius kasında GLUT4'leri arttırırken soleusta arttırmadığı gösterilmiştir (148). Buna göre AMPK düzeyleri denervasyon atrofisinde azalmaktadır. Ayrıca AMPK'nin regülasyonunda hızlı ve yavaş kaslar arasında fark olduğu da görülmektedir.

Bu çalışmada p-AMPK/AMPK düzeylerinin immobilizasyon grubunda azalması mTOR inhibisyonu açısından yorumlandığında mTOR'un AMPK tarafından inhibisyonunun engellendiği anlamına gelmektedir. Ancak p-Akt1 düzeylerinin immobilizasyon grubunda azalması, mTOR'u aktive edecek sinyalin zaten ortada bulunmadığını göstermektedir. Bu durumda immobilizasyonda p-AMPK/AMPK oranındaki azalmanın kullanmama atrofisi ile ilişkili olamayacağını düşündürmektedir.

Benzer şekilde AMPK'nin metabolik görevleri göz önüne alındığında, kas kontraksiyonunun olmadığı ve enerji harcamasına ihtiyaç duyulmadığı immobilizasyon sürecinde kas içi glukoz düzeylerinin ve yağ oksidasyonunun arttırılması da anlamlı görülmemektedir.

Çalışmalar inaktivitenin AMPK aktivitesini azalttığı, aerobik egzersizlerin ise AMPK'yi hızla aktive ettiğini göstermektedir. Han ve diğerleri (2007), iki haftalık kuyruktan asma yoluyla gerçekleştirilen yüksüzleştirmede AMPK aktivasyonunun önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (73). Benzer biçimde 4 haftalık kuyruktan asmada atrofi görülen gastroknemius kasında p-AMPK düzeyleri anlamlı ölçüde azalırken, atrofi görülmeyen tibialis anterior kasında p-AMPK düzeylerinde bir değişiklik gözlenmemiştir (108). İnaktivitenin AMPK

düzeylerini etkilemediğine ilişkin çalışmalar da vardır. İnsanlarda 24 veya 34 günlük yatak istirahatinin AMPK düzeylerini değiştirmeden MuRF1 ve MAFbx düzeylerini arttırarak kas atrofisine yol açtığı bildirilmiştir (29).

Bu tez çalışmasının sonuçları kasın kontraksiyona katılmadığı alçılama yolu ile oluşan immobilizasyonda İ grubunda AMPK aktivasyonunun azaldığını ve AMPK'nin bu tip atrofi modelinde protein sentez veya degradasyonunu kontrol etmediğini düşündürmektedir.

Çalışmada AMPK düzeylerinin immobilizasyon sonrası remobilizasyon döneminde artmaya başladığı ve İT grubunda bu artışın İ grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. İT grubunda kas ağırlığının arttığı göz önüne alınırsa bu çalışma bulguları AMPK düzeylerinin bu deneysel modelde atrofi üzerine etkili olmadığını göstermektedir.

5.7. Hsp72 ve Hsp25 düzeyleri

İskelet kası immobilizasyon, denervasyon, yüksüzleştirme gibi kontraksiyonun ortadan kalktığı kullanılmama koşullarına kas atrofisi ile yanıt verir. İmmobilizasyon sürecinde özellikle yavaş ekstansör postür kasları ağırlığında azalma, kas lifi enine kesit alanında küçülme, çekirdek sayısında azalma ve lif fenotipinde yavaştan hızlıya doğru dönüşüm ile karakterize yeni bir kas mimarisi karşımıza çıkar (68). Aslında kas atrofisi kullanmama karşısında ortaya çıkan bir adaptasyon olarak da değerlendirilebilir. Kas, daha fazla enerji harcamasına yol açan büyük lifler yerine enerjinin korunması ve daha az harcamasını gerektiren küçük liflere sahip olmuştur. Nitekim bu doktora çalışmasında hücrenin enerji düzeyini algılayan molekül olan AMPK'nin fosforile formunun immobilizasyon grubunda azalmış olduğunun görülmesi de, hücrede enerji düzeyi açısından harcama değil de koruma yönünde bir metabolik değişiklik olduğunu göstermektedir. Stres koşullarına en iyi bilinen hücresel yanıtlardan birisi, HSP'lerin indüklenmesidir (153, 107, 3). Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda, HSP miktarlarının sıcak, oksidan stres, çeşitli kimyasal madde ve hormonlar, protein analogları gibi çeşitli stresler karşısında arttığı belirtilmiştir (196). HSP'lerin intrasellüler kompartmanda bulduklarında, sentezlenme sürecinde proteinlerin proteazlar tarafından parçalanmasının engellenmesinde,

onların uygun katlanmalarını sağlanmasında, subsellüler lokalizasyonlarına taşınmasında veya ciddi ölçüde hasara uğramış proteinlerin uzaklaştırılmasında rol aldığı bilinmektedir (76, 61). Bu işlevleri sayesinde, özellikle Hsp72 ve Hsp25 kas hücrelerinde miyofibril stabilizasyonu görevini üstlenirler.

Hsp72, 70kDa HSP ailesinin göze çarpan iki önemli üyesinden stres karşısında indüklenebilir olanıdır. Genel olarak iskelet kasında yüksüzlük HSP düzeylerinde azalmaya, yüklenme ise HSP düzeylerinde artmaya yol açmaktadır (155). Sıçanda kuyruktan asma modelinde 8 veya 14. günde soleus kas ağırlığının ve Hsp72 düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür (130, 141). On dört günlük yüksüzleştirme veya afferent sinir uyarısı inhibisyonunun Hsp27 fosforilasyonunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (86). Bu doktora çalışmasında da benzer şekilde iki haftalık alçılmaya tabi tutulan immobilize sıçanlarda Hsp72 düzeyleri anlamlı ölçüde azalmıştır ($p<0,001$). Diğer yandan çalışma, immobilizasyonun yol açtığı Hsp72 düzeylerindeki azalmanın sadece bir haftalık remobilizasyon uygulaması ile kontrol düzeylerine dönebildiğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında görülen HSP düzeylerindeki değişikliklerin açıklanmasında kas lif tipi ile HSP ekspresyonu arasındaki ilişkinin tartışılması önemli görülmektedir. İskelet kası miyozin fenotipi, HSP bazal düzeylerini belirlemekte olup yavaş tip miyozin izoformlarının olduğu tip I ve tip IIa'dan zengin kaslarda bazal HSP ekspresyonu daha fazla iken tip IIb ve tip IIx'ten zengin kaslarda bu düzey çok daha düşüktür. Bu nedenle özellikle miyozin izoformunun bir tipten diğerine dönüştüğü ya da dönüşüm olmadığı halde kastaki relatif dağılımının değiştiği durumlarda (belirli bir grup kas lifinde atrofi veya hipertrofi) HSP düzeylerinde de değişiklik olacaktır. Nitekim, iskelet kası Hsp72 düzeylerinin kas miyozin fenotipine göre değiştiği ve kas tip I ve tip IIa lif miktarının artışının Hsp72 düzeylerini artırırken, hızlı form olan tip IIx ve tip IIb'nin artışının Hsp72 düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (110, 48). Bu çalışmada miyozin fenotip veya kas lif tipi değişimi incelenmemiş olmakla birlikte miyozin ağır zinciri yarı ömrü üzerinden bir yorum yapmak yerinde olur. Miyozin ağır zinciri yarı ömrünün kalp kasında 5-5,4 gün olduğu bildirilmiştir (28, 117). İskelet kası için net bir rakam bilinmemekle birlikte, Tsika ve diğ (1987),

hipertrofi döneminde zero order sentez kinetiği ve atrofi döneminde first order degradasyon kinetiğinin geçerli olduğunu varsaydıkları lineer model üzerinden hesaplama yapmışlardır. Sinerjist kasın tenatomisi yoluyla plantaris kasında 9 hafta sonunda %92 ağırlık artışı ve takip eden 7 hafta boyunca kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme sonrasında ise kas ağırlığının kontrol grubun %30'u aralığına gerilediğini gördükleri bu çalışmada araştırmacılar sentez sırasında yarı ömrün 19 gün ve degradasyon sırasında bu sürenin 10 gün olduğunu belirtmişlerdir (187). Gerek kardiyak MHC ile ilgili veri ve gerekse iskelet kası MHC'ye ilişkin tahmini rakamlar bu çalışmada gerçekleştirilen iki haftalık atrofının kas lif tipi fenotipinde veya belirli bir lif tipinin kapladığı yüzde alanda değişikliğe yol açmasının mümkün olduğunu göstermektedir. Nitekim kuyruktan asma modelinde 14 günün sonunda soleus kası tip I lifleri enine kesit alanında %63, tip IIa liflerinde ise %47'lik bir azalma görülmüştür (161). Benzer şekilde yedi günlük kuyruktan asmada tip I kas lifi yüzde dağılımının %14 azaldığı ve intermitten kas liflerinin %129 arttığı gösterilmiştir (2). Diğer yandan bir haftalık remobilizasyonun da MHC fenotipi değişikliğine yol açacak düzeyde bir etki sağlaması beklenmemektedir. Kannis ve diğ (1998), üç haftalık tek bacak immobilizasyonunu takiben görülen soleus tip I lifi enine kesit alanındaki düşüşün 3 haftalık remobilizasyon döneminde değişmediğini göstermişlerdir (84).

Büyük oranda tip I lifi içeren soleus kası yüksek düzeyde bazal Hsp72 sergilemektedir. Immobilizasyonda özellikle tip I liflerinin etkilendiği ve tip II lif miktarının arttığı bildirilmektedir. Bu doktora çalışmasında, iki haftalık immobilizasyonun lif tipi üzerine etki edip etmediği bilinmemekle beraber Hsp72 düzeyindeki azalma relatif olarak tip I lifleri miktarının azalmış olmasının da bir sonucu olabilir. Sonuç olarak, I grubunda soleus kası Hsp72 düzeylerinde görülen azalmada lif MHC kompozisyonundaki değişiklik rol oynamış olabilirken IR grubunda görülen Hsp72 düzeylerinin kontrol değerlerine geri dönmesinin MHC değişiminden kaynaklanmayacağı düşünülmektedir.

Sıçanda kuyruktan asma modelinde üçüncü haftanın sonunda sıçanda soleus kası protein sentez hızında %70,2 azalma, protein degradasyonunda ise %52 artma görülmüştür (14). Ku ve diğerleri (1995), yeni sentezlenen

polipeptidlerin elongasyon hızındaki düşüşün protein sentezindeki azalmanın en önemli nedenleri arasında olduğunu bildirmiştir. Keza aynı çalışmada, 12-18 saat yüksüzleştirilmenin polizomal Hsp72 düzeylerinde azalmaya yol açtığı, Hsp72'nin yeni sentezlenen polizoma bağlanarak ribozomal kanala doğru ona eşlik ettiği için azalan polizomal Hsp72'nin yeni sentezlenen polipeptidlerin elongasyon hızındaki azalmanın nedeni olabileceğine dikkat çekilmiştir (95). Hsp72'lerin sadece elongasyon değil inisiyasyon ve translasyona da etki ettiği bildirilmiştir (134). Bu sonuçlar bizim çalışmamızda da sentez hızının azalmasının Hsp72 düzeylerindeki azalmaya katkıda bulunmuş olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, İR grubunda Hsp72 düzeylerinin kontrol seviyelere dönüşünde en azından protein sentezindeki yeni durumun rol oynamış olabileceği görülmektedir.

Hsp72'nin FoxO3 ve NFkB sinyalini inhibe ettiği ve kuyruktan asma yoluyla yapılan yüksüzleştirmede kas atrofisini azalttığı gösterilmiştir (173, 174). Bu çalışmada immobilizasyon grubunda azalmış Hsp72'nin FoxO üzerindeki bazal düzeydeki regülasyonun ortadan kalkması nedeniyle kas atrofisine dolaylı olarak katkıda bulunmuş olabilir.

TVT sırasında mekanik enerjinin doku ve çeşitli kompartmanlardaki vücut sıvılar tarafından absorbe edildiği (191) ve bunun sıcaklık artışına neden olduğu bildirilmiştir (39, 40). HSP ekspresyonunun artan hücre veya tüm vücut sıcaklığına bağlı olarak artması, TVT'nin kas Hsp25 ve Hsp72 ekspresyonunu artıracak hipotezimizi oluşturmamıza neden olmuştur. Buna ek olarak aynı nedenlerle, iki haftalık alçılama yoluyla yapılan immobilizasyon sonrası remobilizasyon döneminde TVT uygulamasının (İT), sadece remobilizasyon uygulanmasına göre (İR) Hsp25 ve Hsp72 düzeylerini daha fazla arttıracak da hipotez edilmiştir. Tez çalışmasının bulguları, TVT uygulamasının (T) hipotezimizde ortaya koyduğumuz gibi Hsp72 düzeylerinde bir artışa yol açmadığını ($p>0,05$) göstermektedir. Çalışmada iki haftalık alçılama sonrası bir haftalık TVT'nin uygulandığı grupta Hsp72 düzeylerinin hala kontrol grubundan daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,005$). Başka bir ifade ile sıçanların immobilizasyon sonrasında serbest bırakılması Hsp72 düzeylerinin kontrol seviyelerine çıkmasını sağlarken, ilave olarak günde 30 dakika, 3mm genlik ve

45Hz frekansta TVT uygulaması hiptezimizin tersine bu etkinin azalmasına yol açmıştır. Nitekim çalışmada, İR grubu ile İT grubu karşılaştırıldığında İT grubundaki Hsp72 düzeylerinin İR grubundan daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Titreşim, TVT formunda (39, 40) veya lokal olarak uygulanmasının kas içi sıcaklığını arttırdığı bildirilmiştir (144, 77). On beş dakika süreli 100Hz frekanslı lokal vibrasyon uygulamasını takiben ön kolda artan deri sıcaklığının 10 dakika boyunca yüksek kaldığı ve deride eriteme yol açtığı gösterilmiştir (144). Keza 16 dakika 45Hz frekansında, 2mm genlikte aralıklı vibrasyon uygulamasının uyluk deri sıcaklığını arttırdığı, bunun kas lif uzunluğunda değişikliğe yol açan refleks kasılmaya bağlı kas içi sıcaklığı artışı ve ısıyı uzaklaştırmak için deri kan akımı artışından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (77). Bu çalışmada denek olarak sıçanlar kullanılmış olup kas içi sıcaklık ölçülmediği için TVT'nin sıçanda kas içi sıcaklığını artırıp artırmadığı bilinmemektedir. Diğer yandan sıçanda 32°C, 24 saat süreli akut sıcak stresi vücut sıcaklığını arttırmadığı bildirilmiştir (192).

Sıcaklık artışı dışında HSP'lerin indüklenmesine ilişkin bir diğer mekanizma olan kas hasarı da çalışmada uygulanan TVT açısından tartışılması gereken bir diğer noktadır. İskelet kas hasarının insanda biceps brachi kasında yapılan 50 tekrarlı yüksek şiddetli eksentrik egzersizin egzersizi takiben 48 saat sonra keratin kinaz ve Hsp27 (İnsanda bulunan Hsp25 formu), Hsp72 düzeylerini arttırdığı, buna karşık 10° negatif eğimde 30 dakika süreli yokuş aşağı koşunun vastus lateralis kasında artışa yol açmadığı görülmüştür (183). İskelet kasında konsantrik veya eksentrik egzersizlerin iskelet kası Hsp72 ekspresyonunu arttırdığı iyi bilinmektedir (125). Sprague Dawley sıçanlarda tibialis anterior kası uzamış veya kısalmış pozisyonda iken elektrik uyarısına tabi tutulduğunda sadece uzamış pozisyondaki uyarıda kas hasarı belirteci olan CK ile Hsp25 ve Hsp72 düzeylerinin arttığı ve uyarıyı takip eden yedi gün boyunca yüksek kaldığı görülmüştür. Yazarlar buradan yola çıkarak kas hasarının artmış HSP'ler için sinyal olabileceği ileri sürmüşlerdir (79). Nitekim Inoue ve diğerleri (2009), dört haftalık alçı yoluyla immobilizasyonun ardından bir hafta remobilizasyon ve pasif germenin soleus Hsp72 ve Hsp25 düzeylerin etkisini inceledikleri çalışmada pasif germenin kas hasarını azaltmasına karşın remobilizasyona göre daha az HSP

sergilediğini belirtmiştir (81). İskelet kasında Hsp72 ve Hsp25 denature olmuş proteinleri yakalayıp onları tekrar fonksiyone olmalarının sağlar ve özellikle miyofibril yapısının stabilize edilmesinde rol alırlar. Bu çalışmalar hasarın varlığı durumunda Hsp25 ve Hsp72 indüklenmesinin daha yüksek düzeyde kaldığını göstermektedir. Sıçan arka bacağına 30, 60, 120 ve 480Hz vibrasyon uygulamalarının plazma kreatin fosfokinaz aktivitesini arttırdığı, en yüksek artışın 30Hz frekansta olduğu ve vibrasyon frekansı yanında uyarının genliğinin de önemli olduğu bildirilmiştir (143).

Bu doktora çalışmasında 30 dakika, 3mm frekans ve 45 Hz genlikte 2'şer dakika aralıklı TVT uygulanmıştır. Bu uygulamanın herhangi bir kas hasarına yol açıp açmadığı bilinmemektedir. Çalışma sonuçlarının, TVT'nin Hsp72 düzeylerini arttırmaması sıçanda kas içi sıcaklığı veya kas hasarının oluşmadığını düşündürmektedir. İmmobilizasyondan sonra remobilizasyonun (İR grubu) Hsp72 düzeylerini anlamlı olarak artırırken TVT'nin remobilizasyona eklenmesinin ise Hsp72 artışını baskılaması (İT grubu) hipotezimizin kabul edilmediğini göstermiştir.

Hsp25 sonuçlarına baktığımızda ise durum biraz farklıdır. Alçı yoluyla yapılan immobilizasyon Hsp25 seviyelerini anlamlı olarak düşürmemiştir ($p>0,05$). İmmobilizasyon sonrasında bir haftalık remobilizasyon (İR) veya bir haftalık remobilizasyon ve TVT uygulaması (İT) ise Hsp25 seviyelerinin kontrol grubundan anlamlı ölçüde artmasına neden olmuştur (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,05$).

Hsp25'nin miyofibriler stabilizasyon, hasarlı proteinlerin onarımı (91, 92, 147) ve apoptozisin azaltılması gibi roller üstlendiği bildirilmiştir (44). Hsp25'in özellikle kas kontraktıl proteinlerinin yıkımına neden olan kaspaz-3 aktivasyonunu (198) inhibe ettiği bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında İR ve İT gruplarında artmış Hsp25 düzeyleri, remobilizasyon döneminde apoptozisin önlenmesinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Naito ve diğerleri (2000), sekiz günlük kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirmeden bir gün önce bir saat boyunca 41°C sıcaklıkta tutulan sıçanlarda Hsp72 düzeylerinin korunduğunu ve bu gruptaki sıçanlarda kuyruktan asma ile oluşan soleus kası atrofisinin %32 oranında azaldığını

göstermiştir. Benzer şekilde, distrofin geninde oluşan bir mutasyon sonucu ortaya çıkan ciddi ve ilerleyici bir kas kaybı olan duchenne kas distrofisi (DMD) fare modelinde, BGP-15 isimli farmakolojik Hsp72 indükleyicisi yoluyla intramüsküler Hsp72 düzeylerinin arttırılmasının, farelerde oluşturulan distrofik patolojiyi azalttığı ve kas kuvvetini koruduğu bildirilmiştir (63). Dolayısıyla önceden intrasellüler düzeyleri arttırılmış olan HSP'ler kas atrofisi ve fonksiyon bozukluğunun engellenmesinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada immobilizasyon öcesinde HSP düzeylerinin arttırılmasına yönelik bir girişim yapılmadığı için artmış HSP'lerin iki haftalık alçı yoluyla oluşan immobilizasyonun yol açtığı atrofiyi önlemede etkisi olup olmadığı test edilmemiş olup, daha sonraki çalışmalarda ele alınması gereken ilginç bir konu olarak durmaktadır.

Son olarak bu çalışmada immobilizasyon Hsp72 ve Hsp25 düzeylerinde bir azalmaya yol açmıştır. Protein sentezi sırasında HSP'lerin yeni oluşan polipeptidlere eşlik ederek onların proteazlar tarafından parçalanmasını önlediği bilinmektedir. Protein sentezinin engellendiği immobilizasyon koşullarında HSP'lerin miktarında azalma olması beklenen bir durumdur.

Sonuç olarak bu çalışmada iki haftalık immobilizasyonun atrofi yollarında yer alan sinyal moleküllerinin miktarlarında önemli ölçüde artışa, protein sentezinde rol alan moleküllerin protein düzeyinde ise azalmaya yol açmıştır. Diğer yandan TVT'nin protein sentezi ile ilgili proteinlerin gerek gen ve gerekse protein düzeyinde ekspresyonunda bir değişiklik söz konusu olmamıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İskelet kası atrofisi, immobilizasyon, denervasyon, periferik sinir zedelenmesi spinal kord yaralanması veya kasın üzerine binen yükün ortadan kalkması yanı sıra yaşlanma, açlık, malnutrüsyon ya da kanser kaşeksisi gibi çok çeşitli fizyolojik veya patolojik koşullarda ortaya çıkan kas kitle ve kuvvet kaybıdır. Spor yaralanması sonrasında ekstremitesi alçı veya atele alınan sporcu örneğinde immobilizasyona bağlı oluşan atrofi sporcunun bir an önce sahalara dönmesini engellemekteyken, ileri yaşlarda kaçınılmaz bir kas kitle ve kuvvet kaybını beraberinde getiren sarkopeni veya kronik hastalıklar nedeniyle oluşan atrofik durumlarda yaşlı ve hastanın kuvvetten düşmesi, günlük işlerini dahi yaparken başkalarına bağımlılığını beraberinde getirmektedir (55). Böylece iskelet kası atrofisi, sadece sportif performansın korunması açısından değil, çok sayıda insanın yaşamını olumsuz etkilemesi açısından da önemli bir sağlık problemidir. Son on yıl içerisinde iskelet kası atrofisi moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına ilişkin önemli gelişmeler elde edilmesine rağmen henüz kas atrofisinin önlenmesine ilişkin bir yöntem veya tedavi modalitesi geliştirilebilmiş değildir.

Bu çalışmada, iskelet kas kitlesi ve kuvvetinde artışa yol açtığı belirtilen tüm vücut titreşiminin (TVT) protein yıkım ve sentezine ilişkin sinyal yollarına etkisi ilk kez incelenmiştir.

Çalışmada iki haftalık alçı yoluyla gerçekleştirilen immobilizasyon protein yıkımına yol açan sinyal moleküllerinin protein düzeyinde artışa, bu yıkımın tersi yönünde işlev gösteren molekülerin ise miktarında azalmaya yol açmıştır. Bu çerçevede p-FoxO3a, p-Akt1, mTOR, p-4EBP1 azalırken, MuRF1, Atrogin/MAFbx düzeyleri artmıştır ($p < 0.05$). İlave olarak immobilizasyon, p-AMPK/AMK oranında ve Hsp72 düzeylerinde de azalmaya yol açmıştır. Remobilizasyon döneminde ise bu değişikliklerin neredeyse tamamında bir geriye dönüş görülmüş olmakla birlikte remobilizasyona TVT'nin eklenmesinin etkinin daha belirgin olmasına yol açtığı görülmüştür. Çalışmada p-Akt1 ve mTOR düzeyleri her iki remobilizasyon grubunda da immobilizasyon grubuna göre artarak ($p < 0.05$) kontrol grubu seviyelerine yükselmiştir. MuRF1 düzeyleri remobilizasyon grubunda immobilizasyon grubundakine benzer şekilde hala

kontrol grubundan yüksek bulunurken, TVT remobilizasyona eklendiğinde MuRF1 düzeylerinin kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Atrogin/MAFbx düzeyleri remobilizasyon grubunda immobilizasyondan farklı olmasa da kontrol düzeylerine düşerken, TVT'nin eklenmesi bu düzeylerin immobilizasyon grubundan anlamlı olarak daha düşük olmasına yol açmıştır ($p<0.05$). Benzer şekilde, her ne kadar hala kontrol grubundan düşük de olsa, fosforile 4EBP1 düzeyleri titreşimin remobilizasyona eklendiği grupta gerek immobilizasyon ve gerekse remobilizasyon grubundan daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuçlar umut verici olup, TVT'nin immobilizasyonu takip eden dönemde kas protein yıkımına sebep olan sinyal moleküllerinin miktarının azalmasında etkili olabileceğini göstermektedir.

Diğer yandan bu çalışmada TVT'nin tek başına sağlıklı sıçanlarda uygulanmasının sinyal yolları üzerine bir etkiye bir etkiye yol açmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada TVT'nin etkinliği mRNA ekspresyonu açısından değerlendirilen genler arasında gruplar arasında anlamlı fark sadece MuRF1'de görülmüştür. Buna göre her üç immobilizasyon grubunda da MuRF1 mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$).

Bu çalışmada elde edilen sonuçların daha ileriye taşınabilmesi için öneriler ise şunlardır:

1- Çalışmada uygulanan TVT'nin frekans, genlik ve süresi sırasıyla 45Hz, aralıklı olarak ve dördüncü günden itibaren toplamda 20dk ve 3mm şeklindedir. Sıçan çalışmalarında 15-90Hz frekans ve 0,1-3mm genlikte farklı sürelerde titreşim uygulandığı düşünülürse, TVT'nin protein sentez ve yıkımına ilişkin sinyal yollarında yer alan temel moleküller üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için söz konusu üç parametrenin de değişik düzeylerde uygulandığı kombinasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

2- Çalışmada immobilizasyon 2 hafta süreli bilateral alçı şeklinde uygulanmıştır. Böylece normalde de uygulanan alçı modeli gerçekleştirilmişse de yarattığı ilave ağırlık ve alçı içerisinde bacağın hareket edip etmediğinin kontrolü mümkün olamadığından ayağın sabit tutulabileceği daha uygun yöntemler değerlendirilebilir.

3- Bu çalışmada birincil amaç TVT'nin etkisinin değerlendirilebilmesi olduğu için, alçı iki hafta süreli uygulanmıştır. Ancak bu süre mRNA seviyelerinde değişiklikler açısından uzun olup amacın immobilizasyon sürecindeki değişiklikleri de görmek olan çalışmalarda grup sayısını arttırarak özellikle 3-5 ve 7. günlerdeki değişiklikleri görmek mümkündür.

4- Bu çalışmada remobilizasyon süreci bir hafta tutulmuş olup bu süredeki değişikliklerin etkisinin değerlendirilmesi ayrı bir çalışma konusudur.

5- Bu çalışmada immobilizasyon sırasında TVT uygulanmamıştır. İmmobilizasyon sırasında TVT'nin yapılabilmesine olanak sağlayan farklı immobilizasyon yöntemleri ile ilgili çalışmalar yapılmasının çarpıcı sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abadi, A., Glover, E. I., Isfort, R. J., Raha, S., Safdar, A., Yasuda, N. ve diğeri. (2009). Limb Immobilization Induces a Coordinate Down-Regulation of Mitochondrial and Other Metabolic Pathways in Men and Women. *PLoS ONE*, 4(8): e6518.
2. Abouddrar, S., Sempore, B., Koubi, H., Dechaud, H. ve Desplanches, D. (1993). Effects of adrenalectomy or RU-486 on rat muscle fibers during hindlimb suspension *Journal of Applied Physiology*, 75(6): 2767-2773.
3. Agarraberes, F. A., Terlecky, S. R., ve Dice, J. F. (1997). An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *Journal of Cell Biology*, 137: 825-834.
4. Allen, D. L. ve Unterman, T. G. (2007). Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292: C188-C199.
5. Andrianjafiniony, T., Dupre-Aucouturier, S., Letexier, D., Couchoux, H. ve Desplanches, D. (2010). Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *American journal of physiology. Cell physiology*, 299: C307-C315.
6. Apró, W., Wang, L., Pontén, M., Blomstrand, E. ve Sahlin, K. (2013). Resistance exercise induced mTORC1 signaling is not impaired by subsequent endurance exercise in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, 305: E22 -E32.
7. Baar, K. ve Esser, K. (1999). Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *American journal of physiology. Cell physiology*, 276: C120-C127.
8. Baehr, L. M., Furlow, J. D. ve Bodine, S. C. (2011). Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *Physiology journal*, 589: 4759-4776.
9. Baker, J. H. ve Matsumoto, D. E. (1988): Adaptation of skeletal muscle to immobilization in a shortened position. *Muscle and Nerve*, 2: 213-244.
10. Baracos, V. (2006). Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 26: 435-461.

11. Barton-Davis, E. R., Shoturma, D. I., Musaro, A., Nadia, Rosenthal, N. ve H. Lee Sweeney. (1998). Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26): 15603-15607.
12. Baskin, K. K., Winders, B. R. ve Olson, E. N. (2015). Muscle as a 'Mediator' of systemic Metabolism. *Cell Metabolism*, 21(2): 237-248.
13. Beckmann, R. P., Mizzen, L. E. ve Welch, W. J. (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, 248(4957): 850-854.
14. Bederman, I. Y., Lai, N., Shuster, J., Henderson, L., Ewart, S. ve Cabrera, M. E. (2015). Chronic hindlimb suspension unloading markedly decreases turnover rates of skeletal and cardiac muscle proteins and adipose tissue triglycerides. *Journal of Applied Physiology*, Vol. 119 no. 1, 16-26.
15. Bergeron, R., Russell, R. R., Young, L. H., Ren, J. M., Marcucci, M., Lee, A. ve Shulman, G. I. (1999). "Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats". *American journal of physiology*, 276 (5 Pt 1): E938-944
16. Bodine, S. C. (2013). Disuse-induced muscle wasting. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10): 2200-2208.
17. Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L. ve diğerleri. (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294, 1704-1708.
18. Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L ve diğerleri (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology*, 3:1014-1019.
19. Bogaerts, A., Delecluse, C., Claessens, A. L., Coudyzer, W., Boonen, S. ve Verschueren, S. M (2007a). Impact of whole-body vibration training versus fitness training on muscle strength and muscle mass in older men: a 1-year randomized controlled trial. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(6): 630-635.

20. Bogaerts, A., Verschueren, S., Delecluse, C., Claessens, A. L. ve Boonen, S. (2007b). Effects of whole body vibration training on postural control in older individuals: a 1 year randomized controlled trial. *Gait Posture*, 26: 309-316.
21. Bolster, D. R., Crozier, S. J., Kimball, S.R., ve Jefferson, L. S., (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 23977-23980.
22. Bolster, D. R., Kubica, N., Crozier, S. J., Williamson, D. L., Farrell, P. A. ve Kimball, S. R. (2003). Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. *Physiology Journal*, 553: 213–220.
23. Bonaldo, P. ve Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models and Mechanisms*, 6(1): 25-39.
24. Booth, F. W. (1978). Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization. *Journal of Applied Physiology*, 44: 225-230.
25. Booth, F. W. (1982). Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 52: 1113-1118.
26. Booth, F. W. ve Criswell, D. S. (1997). Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. *International Journal of Sports Medicine*, 18 Suppl 4: S265-S269.
27. Booth, F. W., ve Seider, M. J. (1979). Recovery of skeletal muscle after 3 months of hindlimb immobilization in rats. *Journal of Applied Physiology*, 47: 435-439.
28. Bray, D. (2001). *Cell Motility* (Ed. Day M). 2. Edition. Garland Publishing, New York, 161.
29. Brocca, L., Cannavino, J., Coletto, L., Biolo, G., Sandri, M., Bottinelli, R. ve Pellegrino, M. A. (2012). The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *Physiology Journal*, 590: 5211-5230.

30. Calnan, D. R. ve Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene*, 27: 2276-2288.
31. Cardinale, M. ve Lim, J. (2003). Electromyography activity of vastus lateralis muscle during whole-body vibrations of different frequencies. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 17: 621-624.
32. Carmeli, E., Hochberg, Z., Livne, E., Lichtenstein, I., Kestelboim, C., Silbermann, M. ve Reznick, A. Z. (1993). Effect of growth hormone on gastrocnemius muscle of aged rats after immobilization. *Biochemistry and Morphology Journal of Applied Physiology*, 75 (4): 1529-1535.
33. Caron, A. Z., Drouin, G., Desrosiers, J., Trenszt, F. ve Grenier, G. (2009). A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *Journal of Applied Physiology*, 106: 2049–2059.
34. Ceccarelli, G., Benedetti, L., Galli, D., Prè, D., Silvani, G., Crosetto, ve diğerleri. (2014). Low-amplitude high frequency vibration down-regulates myostatin and atrogen-1 expression, two components of the atrophy pathway in muscle cells. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 8(5): 396-406.
35. Clark, B. C. (2009). In Vivo Alterations in Skeletal Muscle Form and Function after Disuse Atrophy. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 41(10): 1869-1875.
36. Clarke, B. A., Drujan, D., Willis, M. S., Murphy, L.O. ve Corpina, R. A. (2007). The E3 ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metabolism*, 6: 376-385.
37. Clemmons, D. R. (2009). Role of IGF-1 in skeletal muscle mass maintenance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(7): 349-356.
38. Cochrane D. J., Stannard S. R., Firth E. C. ve Rittweger, J. (2010). The comparison of muscle temperatures during static and dynamic squatting with and without acute vibration exercise. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. 30(4): 223-229.
39. Cochrane D. J., Stannard S. R., Sargeant T. J. ve Rittweger, J. (2008). The rate of muscle temperature increase during acute whole-body vibration exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 103: 441-448.

40. Cohen, S., Brault, J. J., Gygi, S. P., Glass, D. J., Valenzuela, D. M., Gartner, C. ve diğeri. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of Cell Biology*, 185: 1083-1095.
41. Coleman, M. E., DeMayo, F., Yin, K. C., Lee, H. M., Geske, R., Montgomery, C. ve Schwartz, R. J. (1995). *Journal of Biological Chemistry*, 270: 12109-12116.
42. Coletti, D., Moresi, V., Adamo, S., Molinaro, M. ve Sassoon, D. (2005). Tumor necrosis factor- α gene transfer induces cachexia and inhibits muscle regeneration. *Genesis*, 43: 120-128.
43. Concannon, C. G., Gorman, A. M. ve Samali, A. (2003). On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8: 61-70.
44. Cong, H., Sun, L., Liu, C. ve Tien, P. (2011). Inhibition of atrogen-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Human Gene Therapy*, 22: 313-324.
45. Csibi, A., Cornille, K., Leibovitch, M. P., Poupon, A., Tintignac, L. A. ve diğeri. (2010). The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLoS One*, 5(2): e8994.
46. Chanou, K., Gerodimos, V., Karatrantou, K. ve Jamurtas, A. (2012). Whole-Body Vibration and Rehabilitation of Chronic Diseases: A Review of the Literature. *Journal of Sports Science and Medicine*, 11(2): 187-200.
47. Da Silva, M. E., Nunez, V. M., Vaamonde, D., Fernandez, J. M., Poblador, MS, Garcia-Manso, J. M., ve Lancho, J. L. (2006). Effect of different frequencies of whole body vibration on muscular performance. *Biology of Sport*, 23: 267.
48. David, O. E. T., Aubrey, F. K., Zeldin, D. A., Michel, R. A. ve Noble, E. G. (2006). Slower skeletal muscle phenotypes are critical for constitutive expression of Hsp70 in overloaded rat plantaris muscle. *Journal of Applied Physiology*, 100: 981-987.

49. De Boer, M. D., Selby, A., Atherton, P., Smith, K., Seynnes, O. R., Maganaris, C. N. ve diğeri (2007). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *The Journal of Physiology*, 585(1): 241-251.
50. De Palma, L. (2007). Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy. *Joint Bone Spine*, 75: 53-57.
51. Delecluse, C., Roelants, M. ve Verschueren, S. (2003). Strength increase after whole body vibration compared with resistance exercise training. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35(6): 1033-1041.
52. Demirel, H. A., Powers, S. K., Naito, H. ve Tumer, N. (1999). The effects of exercise duration on adrenal HSP72/73 induction in rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, 167: 227-231.
53. Demirel, H. A., Powers, S. K., Naito, H., Hughes, M. ve Coombes, J. S. (1999). Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *Journal of Applied Physiology*, 86(3): 1002-1008.
54. Demirel, H. A., Powers, S. K., Zergeroglu, M. A., Shanely, R. A., Hamilton, K., Coombes, J., ve Naito, N. (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Journal of Applied Physiology*, 91: 2205-2212.
55. Doherty, T. J. (2003). Aging and sarcopenia. *Journal of Applied Physiology*. 95(4): 1717-1727.
56. Egan, B., ve Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, 17: 162-184.
57. Egerman, M. A. ve Glass, D. J. (2014). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(1): 59-68.
58. Elkina, Y., Von Haehling, S., Anker, S. D. ve Springer, J. (2011). The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *Journal of Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2: 143-151.

59. Evans, W. J. ve Ivy, J. L. (1982). Effects of testosterone propionate on hindlimb-immobilized rats. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 52(6): 1643.
60. Fares, F. A., Gruener, N., Carmeli, E. ve Reznick, A. Z. (1996). Growth hormone (GH) retardation of muscle damage due to immobilization in old rats. Possible intervention with a new long-acting recombinant GH. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 786: 430-43.
61. Feder, M. E. ve Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243-282.
62. Felicitas W., Schempf G., Stein, G., Wellmann, K., Manthou, M., Scholl C. ve diğeri. (2013). Whole-Body Vibration Improves Functional Recovery in Spinal Cord Injured Rats. *Journal of Neurotrauma*, 30: 453-468.
63. Gehrig, S. M., van der Poel, C., Sayer, T., Schertzer, J. D., Henstridge, D. C., Church, J. E. ve diğeri. (2012). Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature*, 484: 394-398.
64. Gingras, A. C., Kennedy, S. C., O'Leary, M. A., Sonenberg, N., ve Hay, N. (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & development*, 12: 502-513.
65. Glass, D. J. (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends in Molecular Medicine*, 9(8): 344-350.
66. Glass, D. ve Roubenoff, R. (2010). Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1211: 25-36.
67. Glover, E. I., Phillips, S. M., Oates, B. R., Tang, J. E., Tarnopolsky, M. A ve diğeri. (2008). Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *Journal of Physiology*, 586: 6049-6061.
68. Goldspink, G. (1985). Malleability of the motor system: a comparative approach. *Journal of Experimental Biology*, 115: 375-391.

69. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A. ve Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 14440-14445.
70. Greer, E. L., Dowlatshahi, D., Banko, M. R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S. P. ve Brunet, A. (2007a). An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current Biology*, 17: 1646-1656.
71. Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P. ve Brunet, A. (2007b). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(41): 30107-30119.
72. Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D. M. ve Adams, G. R. (2005). IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 98: 911-917.
73. Han, B., Zhu, M. J. ve Ma, C. (2007). Rat hindlimb unloading down-regulates insulin like growth factor-1 signaling and AMP-activated protein kinase, and leads to severe atrophy of the soleus muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(6): 1115-1123.
74. Handschin, C. ve Spiegelman, B. M. (2008). The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature*, 45: 24.
75. Hardie, D. G. ve Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry*, 246: 259-273.
76. Hartman, D. ve Gething, M. J. (1996). Normal protein folding machinery. In: U. Feige, R.I. Morimoto, I. Yahara & B.S. Polla (eds) *Stress-inducible Responses*. EXS, 77, pp. 3-24. Birkhäuser, Basel.
77. Hazell, T. J., Thomas, G. W., Deguire, J. R. ve Lemon, P. W. (2008). Vertical whole-body vibration does not increase cardiovascular stress to static semi-squat exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 104(5): 903-908.
78. Herndon, L. A., Schmeissner, P. J., Dudaronek, J. M., Brown, P. A., Listner, K. M., Sakano, Y. ve diğeri. (2002). Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*, 419: 808-814.

79. Holwerda, A. M. ve Locke, M. (2014). Hsp25 and Hsp72 content in rat skeletal muscle following controlled shortening and lengthening contractions. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 39(12):1380-1387.
80. Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., Kitano, T., Baldwin, K. M. ve diğerleri. (2001). Space shuttle flight (sts-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB Journal*, 15: 1279-1281.
81. Inoue, T., Suzuki, S., Hagiwara, R., Iwata, M., Banno, Y. ve Okita, M. (2009). Effects of passive stretching on muscle injury and HSP expression during recovery after immobilization in rats. *Pathobiology*, 76(5): 253-259.
82. Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P. ve Bass, J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7: 910-916.
83. Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J. ve diğerleri. (2004). Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 41114-41123.
84. Kannus, P., Jozsa, L., Jarvinen, T. L. N., Kvist, M., Vieno, T., Javinen, T.A.H. ve diğerleri. (1998). Free mobilization and low to high-intensity exercise in immobilization-induced muscleatrophy. *Journal of Applied Physiology*, 84(4): 1418-1424.
85. Kasper, C.E., Talbot, L. A. ve Gaines, J. M (2002). Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clinical Issues*, 13(2): 237-247.
86. Kawano, F., Matsuoka, Y., Oke, Y., Higo, Y., Terada, M., Wang, X. D. ve diğerleri. (2007). Role(s) of nucleoli and phosphorylation of ribosomal protein S6 and/or HSP27 in the regulation of muscle mass. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 293: C35-C44.

87. Kelleher, A. R., Kimball, S. R., Dennis, M. D., Schilder, R. J. ve Jefferson, L. S. (2013). The mTORC1 signaling repressors REDD1/2 are rapidly induced and activation of p70S6K1 by leucine is defective in skeletal muscle of an immobilized rat hindlimb. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 304: E229-236.
88. Kelleher, A. R., Pereira, S. L., Jefferson, L. S. ve Kimball, S. R. (2015). REDD2 expression in rat skeletal muscle correlates with nutrient-induced activation of mTORC1: responses to aging, immobilization, and remobilization. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 308(2): E122-129.
89. Kenny, P. G., Périard, J., Journeay, W. S., Sigal, R. J. ve Reardon, F. D. (2003). Effect of exercise intensity on the postexercise sweating threshold. *Journal of Applied Physiology*, 95: 6: 2355-2360.
90. Keusch, G. (2003). The history of nutrition: malnutrition, infection, and immunity. *Journal of Nutrition* 133: 336S-340S.
91. Koh, T. J. (2002). Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 30: 117-121.
92. Koh, T. J. ve Escobedo, J. (2004). Cytoskeletal disruption and small heat shock protein translocation immediately after lengthening contractions. *American journal of physiology. Cell physiology*, 286: C713-C722.
93. Krawiec, B. J., Frost, R. A., Vary, T. C., Jefferson, L. S. ve Lang, C. H. (2005). Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 289(6): E969-80.
94. Krawiec, B. J., Nystrom G. J., Frost R. A., Jefferson L. S., ve Lang C. H. (2007). AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292: E1555-E1567,
95. Ku, Z., J. Menon Y. V. ve Thomason, D. B. (1995). Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology. Cell Physiology*, 268: C1369-C1374.

96. Kubica, N., Bolster, D. R., Farrell, P. A., Kimball, S. R. ve Jefferson, L. S. (2005). Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2B epsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 7570–7580.
97. Laghi, F., Adiguzel, N. ve Tobin, M. J. (2009). Endocrinological derangements in COPD. *The European Respiratory Journal*, 34: 975-996.
98. Lai, K-M.V., Gonzalez, M., Poueymirou, W. T., Kline, W. O. ve Na, E. (2004). Conditional activation of Akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Molecular Cell Biology*, 24: 9295-9304.
99. Lalani, R., Bhasin, S., Byhower, F., Tarnuzzer, R., Grant, M. ve diğerleri. (2000). Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *Journal of Endocrinology*, 167: 417-428.
100. Lang, S. M., Kazi, A. A., Hong-Brown, L. ve Lang, C. H (2012). Delayed recovery of skeletal muscle mass following hindlimb immobilization in mTOR heterozygous mice. *PLoS One*, 7(6): e38910.
101. Laplante, M. ve Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149: 274-293.
102. Larsson, L., Müller, U., Li X ve Schiaffino, S. (1995). Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta physiologica Scandinavica*, 153(2): 109-116.
103. Lee, S. J. ve McPherron, A. C. (1999). Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9: 604-607.
104. Lee, S. J. ve McPherron, A. C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 9306-9311.
105. Lee, S.W., Dai, G., Hu, Z., Wang, X., Du, J. ve Mitch, W. E. (2004). Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *Journal of The American Society Nephrology*, 15: 1537-1545.

106. Lepore, D. A., Hurley, J. V., Stewart, A. G., Morrison, W. A., ve Anderson, R. L. (2000). Prior heat stress improves survival of ischemic-reperfused skeletal muscle in vivo. *Muscle and Nerve*, 23: 1847-1855.
107. Lindquist, S. (1986). The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 1151-1191.
108. Liu, J., Peng, Y., Cui, Z., Wu, Z., Qian, A., Shang, P. ve diğerleri. (2012). Depressed Mitochondrial Biogenesis and Dynamic Remodeling in Mouse Tibialis Anterior and Gastrocnemius Induced by 4-week Hindlimb Unloading. *Life*, 64(11): 901-910.
109. Lixandrão, M. E., Damas, F., Traina Chacon-Mikahil, M. P., Cavaglieri, C. R., Ugrinowitsch, C., Bottaro, M. ve diğerleri (2015). Time-course of resistance training-induced muscle hypertrophy in elderly. *Journal of Strength and Conditioning Research*, Jun 18. [Epub ahead of print]
110. Locke, M., Atkinson, B. G., Tanguay, R. M. ve Noble, E. G. (1994). Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *American Journal of Physiology*, 266: C1240-C1246.
111. Lokireddy, S., McFarlane, C., Ge, X., Zhang, H., Sze, S.K. ve diğerleri. (2011). Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Molecular Endocrinology*, 25(11): 1936-1949.
112. Machado, A., Garcia-Lopez, D., Gonzalez-Gallego, J. ve Garatachea, N. (2010). Whole-body vibration training increases muscle strength and mass in older women: a randomized-controlled trial. *Scandinavian journal of medicine and science in sports*, 20: 200-207.
113. Machida, S. ve Booth, F. W. (2004). Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(1):52-59.
114. Maeda, H., Kimmel, D. B., Raab, D. M. ve Lane, N. E. (1993). Musculoskeletal recovery following hindlimb immobilization in adult female rats. *Bone* 14, 153-159.

115. Manthou, M., Nohroudi, K., Moscarino, S., Rehberg, F., Stein, G., Jansen, R. ve diğerleri. (2015). Functional recovery after experimental spinal cord compression and whole body vibration therapy requires a balanced revascularization of the injured site. *Restorative neurology and neuroscience*, 33(2):233-249.
116. Marín, P. J. ve Rhea, M. R., (2010). Effects of vibration training on muscle strength: a meta-analysis. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(2):548-556.
117. Martin, A., Rabinowitz, M., Blough, R., Prior, G. ve Zak, R. (1977). Measurement of half life of cardiac myosin heavy chain with leucyl -tRNA used as precursor pool. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(10):3422-3429.
118. Martin, B. J. ve Park, H. (1997). Analysis of the tonic vibration reflex: influence of vibration variables on motor unit synchronization and fatigue. *European Journal of Applied Physiology*, 75: 504-511.
119. Martínez-Pardo, E., Romero-Arenas, S., Martínez-Ruiz, E., Rubio-Arias, J. A. ve Alcaraz, P. E. (2014). Effect of a whole-body vibration training modifying the training frequency of workouts per week in active adults. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 28(11):3255-3263.
120. Mavalli, M. D., DiGirolamo, D. J., Fan, Y., Riddle, R. C., Campbell, K. S. ve diğerleri. (2010). Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 4007-4020.
121. McMahon, C. D., Popovic, L., Oldham, J. M., Jeanplog, F., Smith, H. K. ve Kambadur, R. (2003). Myostatin-deficient mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hindlimb suspension. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 285(1): E82-E87.
122. McPherron, A. C., Lawyer, A. M., Lee, S. J (1997a). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387(6628): 83-90.
123. McPherron, A. C. ve Lee, S. J. (1997b). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 12457-12461.

124. Metter, E. J., Talbot, L. A., Schrager, M. ve Conwit, R. (2002). Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 57: B359-B365.
125. Mikkelsen, U. R., Paulsen, G., Schjerling, P., Helmark, I. C., Langberg, H., Kjær, M. ve Heinemeier, K. M. (2013). The heat shock protein response following eccentric exercise in human skeletal muscle is unaffected by local NSAID infusion. *European Journal of Applied Physiology*, 113(7): 1883-1893.
126. Morton, J. P., MacLaren, D. P., Cable, N. T., Campbell, I. T., Evans, L., Bongers, T. ve diğerleri. (2007). Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. *Acta Physiologica Scandinavica*, 190: 319-327.
127. Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G. ve diğerleri (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature Genetics*, 27(2): 195-200.
128. Nader, G. A. (2005). Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 1985-1996.
129. Nader, G.A., Von Walden, F., Liu, C., Lindvall, J., Gutmann, L. ve diğerleri. (2014). Resistance exercise training modulates acute gene expression during human skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, 116(6): 693-702.
130. Naito, H., Powers, S. K., Demirel, H. A., Sugiura, T., Dodd, S. L., ve JAoki, J. (2000). Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb unweighted rats. *Journal of Applied Physiology*, 88: 359-363.
131. Nakashima, K. ve Yakabe, Y. (2007). AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 1650-1656.

132. Narici, M. V. ve Maganaris, C. N. (2007). Plasticity of the muscle-tendon complex with disuse and aging. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 35(3): 126-134.
133. Nedergaard, A., Jespersen, J. G., Pingel, J., Christensen, B., Sroczynski, N., Langberg, H. ve diğeri. (2012). Effects of 2 weeks lower limb immobilization and two separate rehabilitation regimens on gastrocnemius muscle protein turnover signaling and normalization genes. *BMC Research Notes*, 5: 166.
134. Nelson, R. J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M., ve Craig, E. A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell*, 71: 97-105.
135. Noble, C. W., Melling, J. ve Milne, K. J. (2010). HSP, Exercise and Skeletal Muscle In: *Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology* (eds. Alexander A. A. Asea and Bente K. Pedersen). Springer, London. pp, 288-316.
136. Noble, E. G. (2002). Heat shock proteins and their induction with exercise. In: *Exercise and Stress Response: Role of Stress Proteins*. (eds. M. Locke and E.G. Noble). CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 43-78.
137. Noble, E. G., Milne, K. J. ve Melling, C. J. W. (2008). Heat shock proteins and exercise: *A primer. Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 33: 1050–1065.
138. O'Neill, D. E. ve Noble, E. G. (2004). Constitutive expression of inducible Hsp70 is linked to natural shifts in skeletal muscle phenotype. *Acta Physiologica Scandinavica*, 181: 35-41.
139. O'Neill, D. E., Aubrey, F. K., Zeldin, D. A., Michel, R. N. ve Noble, E. G. (2006) Slower skeletal muscle phenotypes are critical for constitutive expression of Hsp70 in overloaded rat plantaris muscle. *Journal of Applied Physiology*, 100: 981-987.
140. Ogura, Y., Naito, H., Akin, S., Ichinoseki-Sekine, N., Kurosaka, M., Kakigi, R. ve diğeri. (2008). Elevation of body temperature is an essential factor for exercise increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 294: R1600-R1607.

141. Oishi, Y., Ogata, T., Yamamoto, K. I., Terada, M., Ohira, T., Ohira, Y. ve diğerleri (2008). Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiologica*, 192: 381-395.
142. Ojuka, E. O., Jones, T. E., Nolte, L. A., Chen, M., Wamhoff, B. R., Sturek, M. ve Holloszy, J. O. (2002). "Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca(2+)". *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, 282 (5): E1008-13.
143. Okada, A. (1986). Physiological response of the rat to different vibration frequencies. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 12(4):362-364.
144. Oliveri, D. J., Lynn, K. ve Hong, C. Z. (1989). Increased skin temperature after vibratory stimulation. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 68(2):81-85.
145. Osawa, Y., Oguma, Y. ve Ishii, N. (2013). The effects of whole body vibration on muscle strength and power: a meta-analysis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 13(3): 380-390.
146. Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Cree, M.G., Hewlings, S.J., Aarsland, A. ve diğerleri. (2006). Atrophy and impaired muscle protein synthesis during prolonged inactivity and stress. *The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism*, 91(12): 4836-4841.
147. Paulsen, G., Vissing, K., Kalkhovde, J. M., Ugelstad, I., Bayer, M. L., Kadi, F. ve diğerleri. (2007). Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293: R844-R853.
148. Paulsen, S. R., Rubink, D. S. ve Winder, W. W. (2001). AMP-activated protein kinase activation prevents denervation-induced decline in gastrocnemius GLUT-4. *J Applied Physiology*, 91: 2102-2108.
149. Pedersen, B. K. ve Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiological Reviews*, 88: 1379-1406.

150. Pedersen, B. K., Akerstrom, T. C., Nielsen, A. R., Fischer, C. P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology*, 103: 1093-1098.
151. Phillips, B. E., Williams, J. P., Gustafsson, T., Bouchard, C., Rankinen, T., Knudsen, S. ve diğeri. (2013). Molecular Networks of Human Muscle Adaptation to Exercise and Age. *PLoS Genetics*. 9(3): e1003389.
152. Polge, C., Heng, A. E., Jarzaguat, M., Ventadour, S., Claustre, A. ve diğeri. (2011). Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB Journal*, 25: 3790-3802.
153. Polge, C., Heng, A. E., Combaret, L., Béchet, D., Taillandier, D. ve Attaix, D. (2013). Recent progress in elucidating signalling proteolytic pathways in muscle wasting: Potential clinical implications. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(Suppl 1): S1-S5.
154. Ponticos, M., Lu, Q. L., Morgan, J. E., Hardie, D. G., Partridge, T. A. ve Carling, D. (1998). Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *The EMBO Journal*, 17: 1688-1699.
155. Powers, S. K., Demirel, H. A., Vincent, H. K., Coombes, J. S., Naito, H., Hamilton, K. L., ve diğeri. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *American Journal of Physiology*, 275(5): R1468-477.
156. Powers, S. K., Locke, M. ve Demirel A. H. (2001). Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(3): 386-392.
157. Prisby, R. D., Lafage-Proust, M. H., Malaval, L., Belli, A. ve Vico, L. (2008). Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: What we know and what we need to know. *Ageing Research Reviews*, 7: 319-329.
158. Reardon, K. A., Davis, J., Kapsa, R. M., Choong, P. ve Byrne, E. (2001). Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle and Nerve*, 24: 893-899.

159. Reid, M. B., Judge, A. R. ve Bodine, S. C. (2014). CrossTalk opposing view: The dominant mechanism causing disuse muscle atrophy is proteolysis. *Physiology Journal*, 592(24): 5345-5347.
160. Reznick, A. Z., Volpin, G., Ben-Ari, H., Silbermann, M. ve Stein, H. (1995). Biochemical and morphological studies on rat skeletal muscles following prolonged immobilization of the knee joint by external fixation and plaster cast: a comparative study. *European Journal of Experimental Musculoskeletal Research*, 4: 69-76.
161. Riley, D. A., Slocum G. R., Bain, J. L., Sedlak F. R., Sowa, T. E. ve Mellender J. W. (1990). Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *Journal of Applied Physiology*, 69(1): 58-66.
162. Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C. ve diğeri. (2009). Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *Journal of Cell Biology*, 187: 859-874.
163. Romanello, V., Guadagnin, E., Gomes, L., Roder, I., Sandri, C., Petersen, ve diğeri. (2010). Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *The EMBO Journal*, 29: 1774-1785.
164. Satchek, J. M., Hyatt, J. P., Raffaello, A., Jagoe, R. T., Roy, R. R. ve diğeri. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB Journal*, 21: 140-155.
165. Satchek, J., Ohtsuka, A., McLary, M. ve Goldberg, A. (2004). IGF-1 stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin-ligases, atrogin-1 and MuRF1. *American Journal of Physiology*, 287: E591-E601.
166. Saltin, B., Gagge, A. P. ve Stolwijk, J. A. (1968). Muscle temperature during submaximal exercise in man. *Journal of Applied Physiology*, 25(6):679-688.
167. Sanchez, A. M., Csibi, A., Raibon, A., Cornille, K., Gay, S., Bernardi, H. ve Candau, R. (2012). AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(2): 695-710.

168. Sanchez, A. M., Candau, R. B. ve Bernardi, H. (2013). FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(9):1657-71.
169. Sandri, M. (2008). Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology*, 23(3): 160-170.
170. Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E. ve diğerleri. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117: 399-412.
171. Schiaffino, S. ve Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, 1: 4.
172. Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B. ve Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal*, 280: 4294-4314.
173. Schneider, C. A., Rasband, W. S. Ve Eliceiri, K. W (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* 9: 671-675.
174. Shanely, R. A., Zergeroglu, M. A., Lennon, S. L., Sugiura, T., Yimlamai, T., Enns, D., Belcastro, A. ve Powers, S. K. (2002). Mechanical ventilation- induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166: 1369-1374.
175. Song, K., Wang, H., Krebs, T. L. ve Danielpour, D. (2006). Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF- β /ALK5-mediated Smad3 activation. *EMBO Journal*, 25(1): 58-69.
176. Sreekumaran, K. N. (2005). Aging muscle. *The American journal of clinical nutrition*, 81: 953-963.
177. Stefano, Schiaffino, Kenneth A. Dyar, Stefano Ciciliot, Bert Blaauw ve Marco Sandri. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal*, 280: 4294-4314.
178. Stewart, C. E. ve Rittweger, J. (2006). Adaptative processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 6: 73-86.

179. Taillandier, D., Aurousseau, E., Meynial-Denis, D., Bechet, D., Ferrara, M., Cottin, P. ve diğerleri. (1996). Coordinate activation of lysosomal Ca²⁺ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochemical Journal*, 316: 65-72.
180. Talbert, E. E., Smuder, A. J., Min, K., Kwon, O. S. ve Powers, S. K. (2013). Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-induced limb muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 114: 1482-1489.
181. Thomason, D. B., Biggs, R. B. ve Booth, F. W. (1989). Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *American journal of physiology*, 257(2 Pt 2): R300-R305.
182. Thompson, H. S., Maynard, E. B., Morales, E. R. ve Scordilis, S. P. (2003). Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178(1):61-72.
183. Thomson, D. M. ve Gordon S. E. (2005). Diminished overload-induced hypertrophy in aged fast-twitch skeletal muscle is associated with AMPK hyperphosphorylation. *Journal of Applied Physiology*, 98: 557-564.
184. Tintignac, L. A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M. P. ve Leibovitch, S. A (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 2847-2856.
185. Tissieres, A., Mitchell, H. K. ve Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84: 389-398.
186. Tsika, R. W., Herrick, R. E. ve Baldwin, K. M. (1987). Time course adaptations in rat skeletal muscle isomyosins during compensatory growth and regression. *Journal of Applied Physiology*, 63(5):2111-21.
187. Tupling, A. R., Bombardier, E., Stewart, R. D., Vigna, C., ve Aqui, A. E. (2007) Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *Journal of Applied Physiology*, 103: 2105-2111.
188. Venojärvi, M., Kvist, M., Jozsa, L., Kalimo, H., Hänninen, O., Atalay, M. (2007). Skeletal muscle HSP expression in response to immobilization and remobilization *Int Journal of Sports Medicine*, 28(4):281-286.

189. Wakeling, J. M., Nigg, B. M. ve Rozitis (2002). Muscle activity damps the soft tissue resonance that occurs in response to pulsed and continuous vibrations. *Journal of Applied Physiology*, 93(3): 1093-1103.
190. Wang, L. I., Liu, F., Luo, Y., Zhu, L. ve Li, G. (2015). Effect of acute heat stress on adrenocorticotrophic hormone, cortisol, interleukin-2, interleukin-12 and apoptosis gene expression in rats. *Biomedical Reports*, 3(3): 425-429.
191. Wang, X., Li W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R. ve Proud, C. G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO Journal*, 20: 4370-4379.
192. Watanabe, Y., Madarame, H., Ogasawara, R., Nakazato, K. ve Naokata. (2014). Effect of very low-intensity resistance training with slow movement on muscle size and strength in healthy older adults. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 34, pp463–470.
193. Wehling, M., Cai, B. ve Tidball, J. G. (2000). Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB Journal*, 14: 103-110.
194. Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, 72: 1063-1081.
195. Welsh, M. J. ve Gaestel, M. (1998). Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 28-35.
196. Welle, S., Burgess, K. ve Mehta, S. (2009). Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296: E567–E572.
197. Wilcock, I. M., Whatman, C., Harris, N. ve Keogh, J. W. (2009). Vibration training: could it enhance the strength, power, or speed of athletes? *Journal of Strength and Conditioning Research*, 23(2): 593-603.
198. Williams, P. E. (1990). Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. *Annals of the rheumatic diseases*, 49: 316-317.

199. Williamson, D. L., Bolster, D. R., Kimball, S. R. ve Jefferson, L. S. (2006). Time course changes in signaling pathways and protein synthesis in C2C12 myotubes following AMPK activation by AICAR. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 291: E80-E89.
200. Wolfe, R. R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 475-482.
201. Wu, C. L., Cornwell, E. W., Jackman, R. W. ve Kandarian, S. C. (2014). NF- κ B but not FoxO sites in the MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 306(8): C762-C767.
202. Zarzhevsky, N., Carmeli, E., Fuchs, D., Coleman, R., Stein, H. ve Reznick, A. Z. (2001). Recovery of muscles of old rats after hindlimb immobilisation by external fixation is impaired compared with those of young rats. *Experimental gerontology*, 36(1): 125-140.
203. Zdanowicz, M. M., Moyse, J., Wingertzahn, M. A., O'Conner, M., Teichberg, S. ve Slonim, A. E. (1995). Effect of insulin-like growth factor I in murine muscular dystrophy. *Endocrinology*, 136: 4880-4886.
204. Zhou, X., Wang, J. L., Lu, J., Song, Y., Kwak, K. S. ve diğeri. (2010). Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*, 142: 531-543.