

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

**YAŞAM ALANI SINIRLANDIRILAN SIÇANLARIN İSKELET KASINDA  
OKSİDATİF HASARIN İNCELENMESİ**

**İrem GÜNGÖR**

**Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2022**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAŞAM ALANI SINIRLANDIRILAN SIÇANLARIN İSKELET KASINDA  
OKSİDATİF HASARIN İNCELENMESİ

İrem GÜNGÖR

Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Şenay Akın

ANKARA  
2022

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YAŞAM ALANI SINIRLANDIRILAN SIÇANLARIN İSKELET KASINDA OKSİDATİF**  
**HASARIN İNCELENMESİ**

**İrem GÜNGÖR**

**Doç. Dr. Şenay AKIN**

Bu tez çalışması 15.12.2022 tarihinde jürimiz tarafından “Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Haydar DEMİREL*  
*Hacettepe Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi*
- Tez Danışmanı:** *Doç Dr. Şenay AKIN*  
*Hacettepe Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi*
- Üye:** *Prof. Dr. Tahir HAZIR*  
*Hacettepe Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi*
- Üye:** *Doç. Dr. Tuba MELEKOĞLU*  
*Akdeniz Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi*
- Üye:** *Dr. Öğr. Üyesi Fırat AKAT*  
*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

*Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN*

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

02 /01/2023

İrem Güngör

<sup>1</sup>“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

(2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Şenay Akın danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

*İrem Güngör*

## TEŞEKKÜR

Hiç şüphesiz bu çalışma süresince öğrendiğim en önemli kazanım, olayların arkasındaki nedenselliği sorgulamak ve araştırmaların temel amacının bir sonuca ulaşmaktan öte sonuca giden yoldaki etkenlerle bir bütün olarak harmanlanıp yorumlanması gerektiğinin bilincine varmak oldu. Bu farkındalığı kazanmamda yaptığı yönlendirmeler ve sorduğu sorularla tez çalışmam boyunca benden desteğini bir an bile esirgemeyen, tecrübe ve donanımıyla bana rehberlik eden, her zaman yanımda ve yakınımda olan danışman hocam Doç. Dr. Şenay Akın'a teşekkür ederim.

Tez konumu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana yol gösteren, bilime olan tutkusu ve etik anlayışıyla kendisini bir bilim insanı olarak örnek aldığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Haydar Demirel'e teşekkürlerimi arz ederim.

Bu süreçte bana destek veren ve yardımlarını esirgemeyen, motivasyonumda önemli rolleri olan çalışma arkadaşlarım Ümit Hayta ve Mert Güleç'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Şu an sahip olduğum tüm imkanlara kavuşmamda şüphesiz en önemli rolü üstlenen annem Gülsen Güngör, babam Ahmet Güngör ve Gülüş Annem'e bütün eğitim hayatım boyunca olduğu gibi bu tez çalışmamda da beni yüreklendirdikleri ve her şartta yanımda oldukları için teşekkür ederim.

## ÖZET

**Güngör, İ. Yaşam Alanı Sınırlandırılan Sıçanların İskelet Kasında Oksidatif Hasarın İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022.** İskelet kası yalnızca kuvvet üretiminden sorumlu olmayıp, metabolik homeostazın korunması, glisemik kontrolün sağlanması ve metabolik genlerin regülasyonunda son derece kritik bir role sahiptir. Kemik kırıkları veya yumuşak doku yaralanmaları nedeniyle alçı ya da atel uygulamaları, travma ve operasyonlar sonrası uzun süreli yatak istirahati gibi immobilizasyon koşulları iskelet kaslarını yapısal ve fonksiyonel olarak olumsuz yönde etkileyerek iskelet kası atrofisine neden olur. Normal koşullarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi bir denge halindeyken, immobilizasyon sürecinde bu dengenin serbest radikallerin artışıyla bozulması önemli hücresel yapılara katılan lipid, protein, nükleik asit gibi moleküllerin okside olmasıyla sonuçlanır. Immobilizasyonun neden olduğu hücresel süreçler ve mekanizmaları araştırmak için deney hayvanlarında uygulanan alçılama, kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme gibi modeller immobilizasyonun serbest radikal düzeylerindeki artışı net bir şekilde ortaya koymaktadır. Öte yandan, bu modeller insanda uzun süreli yatak istirahati ve inaktivite gerektiren koşulları tam olarak yansıtmamaktadır. Standart kafes hacminin küçültülmesiyle oluşturulan yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modelinin insanlardaki yatak istirahatinin bir zorunluluğu olan immobilizasyon koşullarını, alçılama ve yüksüzleştirme modellerine göre daha iyi taklit eden bir model olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma, yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modelinin iskelet kasında oksidatif stres belirteçleri ve iskelet kası atrofisi üzerine etkisini değerlendirilmeyi amaçlanmıştır. Wistar albino sıçanlar kontrol (K; n=8) ve immobilizasyon (İ; n=8) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. K grubundaki hayvanlar standart sıçan kafeslerinde, İ grubundaki hayvanlar ise yaşam alanı sınırlandırılmış kafeslerde yedi gün barındırılmıştır. Deney protokolünün tamamlanmasının ardından, hayvanlar derin anestezi altındayken ötenazi yapılarak soleus kasları izole edilmiştir. Immobilizasyonun oksidatif hasara etkisini araştırmak üzere soleus kasında protein oksidasyonu belirteci olan protein karbonil ve ileri protein oksidasyonu (AOPP) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ve lipid peroksidasyonu belirteci olan 4-hidroksinonenal (4-HNE) düzeyleri Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu modelde yedi gün süresince uygulanan immobilizasyon, soleus kas ağırlığının vücut ağırlığına oranında %17,2 azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, soleus kasında AOPP (p=0,000) ve 4-HNE düzeylerinin (p=0,013) kontrol grubuna göre arttığı ancak protein karbonil düzeylerinin (p=0,846) değişmediği görülmüştür. Bu bulgular, insanlarda nöral uyarıların oldukça azaldığı yatak istirahati ve inaktiviteyi taklit eden bir model olan yaşam alanı sınırlandırılmış kafeslerde barındırılan hayvanların iskelet kasında oksidatif hasarın arttığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Yatak istirahati, immobilizasyon, yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeli, oksidatif stres



## ABSTRACT

**Güngör, İ. Investigation of Oxidative Damage Based on Cage Volume Reduction in Rat Skeletal Muscle. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences MSc. Thesis in Sport Sciences and Technology, Ankara, 2022.** In addition to its primary function in maintaining body posture and movement, skeletal muscle is critical in regulating metabolic genes and maintaining metabolic homeostasis and glycemic control. Splint or casting immobilization due to bone fractures and prolonged bed rest after trauma and operations have an adverse effect on skeletal muscle structure and function, causing skeletal muscle atrophy. A balance between the production of free radicals and the antioxidant defense system is necessary for cellular functions. Increased free radical production causes the oxidation of lipids, proteins, and nucleic acids, which is defined as oxidative stress. Studies using immobilization models in animals such as casting and hind limb suspension have demonstrated an increase in oxidative stress biomarkers. However, these animal models are different in terms of the degree of inactivity, and they do not mimic long-term bed rest in humans. A new immobilization model has been designed based on cage volume reduction. It has been reported that this model mimics better reduced daily ambulatory motions and inactivity in bed rest conditions compared to casting and unloading models. Therefore, it is aimed to be investigated the effect of seven days of immobilization based on cage volume reduction on oxidative stress markers such as lipid peroxidation and protein oxidation in the soleus muscle. Wistar albino rats were randomly divided into control (C; n=8) and immobilization (I; n=8). Animals in group C were housed in standard rat cages whereas in group I were housed in a cage volume reduction modal for seven days. Following the experimental procedure, soleus muscles were isolated. To investigate the effect of immobilization on oxidative damage, protein carbonyl, and advanced oxidation protein products (AOPP) were analyzed spectrophotometrically as protein oxidation markers. 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels were analyzed by Western Blot as a lipid peroxidation marker. Seven days of immobilization in cage volume reduction caused a 17,2% decrease in the ratio of soleus/body weight. AOPP (p=0,000) and 4-HNE levels (p=0,013) were increased in group I compared to group C, but protein carbonyl levels did not change in soleus muscle (p=0,846). These findings show that oxidative damage in rat skeletal muscle by using a cage volume reduction model mimics bed rest and inactivity, where neural stimuli are greatly reduced in humans.

**Key Words:** Bed rest, immobilization, cage volume reduction, oxidative stress

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGE ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Amaç ve Hipotezler	2
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Serbest Radikaller	4
2.1.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	5
2.1.2. Antioksidan Savunma Sistemi	7
2.2. Oksidatif Stres ve Radikallerin Biyolojik Hedefleri	8
2.2.1. Protein Oksidasyonu	9
2.2.2. Lipid Peroksidasyonu	12
2.3. Serbest Radikallerin İskelet Kasları Açısından Fizyolojik Rolü	12
2.4. İmmobilizasyon Sürecinde Oksidatif Stres	13
2.4.1. İmmobilizasyon Sürecinde ROS Üretiminden Sorumlu Mekanizmalar	13
2.4.2. Oksidatif Stresin İmmobilizasyona Bağlı Kronik Hastalıkların Gelişimindeki Rolü	16
2.5. İmmobilizasyon Modellerinde Oksidatif Stres	17
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	
3.1. Araştırma Grubu	22
3.1.1. Deney Grupları	22
3.2. Deney Protokolü	23

3.2.1. İmmobilizasyon Modeli	23
3.2.2. Ötenazi ve Doku İzolasyonu:	24
3.3. Analiz Yöntemleri	24
3.3.1. Protein Karbonil Ölçümü İçin Doku Homojenatının Hazırlanması	24
3.3.2. Nükleik Asitlerin Uzaklaştırılması	25
3.3.3. Protein Karbonil Ölçümü	25
3.3.4. Protein Karbonil Sonuçlarının Hesaplanması	28
3.3.5. Western Blot Yöntemiyle 4-HNE Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Doku Homojenatlarının Hazırlanması	28
3.3.6. Western Blot Analizi	28
3.3.7. AOPP Analizi İçin Doku Homojenatlarının Hazırlanması	29
3.3.8. AOPP Analizi	29
3.3.9. Verilerin Analizi	30
<b>4. BULGULAR</b>	
4.1. Vücut ve Kas Ağırlıkları Bulguları	31
4.2. Protein Karbonil Ölçümü Bulguları	34
4.3. AOPP Bulguları	35
4.4. Protein Analizi Bulguları	36
<b>5. TARTIŞMA</b>	38
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	47
<b>7. KAYNAKÇA</b>	48
<b>8. EKLER</b>	
8.1. Ek-1: Etik Kurul Onayı	
8.2. Ek-2: Orjinallik Raporu	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>8-OH-dG</b>	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
<b>4-HNE</b>	4-hidroksinonenal
<b>AOPP</b>	İleri protein oksidasyonu ürünleri
<b>ARE</b>	Antioksidan yanıt elementi
<b>AMPK</b>	AMP ile aktive olan kinaz
<b>BCA</b>	Bikinkoninik asit metodu
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>ÇDYA</b>	Çoklu doymamış yağ asidi
<b>DNP</b>	2,4-dinitrofenilhidrazin
<b>EDL</b>	Ekstensör digitorum longus
<b>ETZ</b>	Elektron transport zinciri
<b>GPX</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	Glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	Glutasyon
<b>GSSG</b>	Glutasyon disülfid
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HOCl</b>	Hipokloröz asit
<b>HRP</b>	Horse radish peroxidase
<b>Keap 1</b>	Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1
<b>KI</b>	Potasyum iyodür
<b>L<sup>•</sup></b>	Karbon radikali
<b>LOO<sup>•</sup></b>	Peroksil radikali
<b>LOOH</b>	Lipid hidroperoksit
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>NO<sup>•</sup></b>	Nitrik oksit
<b>Nrf2</b>	Nükleer eritroid 2 ilişkili faktör
<b>NT</b>	Nitrotirozin
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Süperoksit radikali

<b>OH<sup>·</sup></b>	Hidroksil radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroksinitrit
<b>RNS</b>	Reaktif nitrojen türleri
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>-S</b>	Tiyil
<b>-SH</b>	Tiyol grubu
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>TBARS</b>	Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri

## ŞEKİLLER

### Şekil

2.1.	Bazı reaktif oksijen türlerinin üretimi.	5
2.2.	Antioksidanlar tarafından serbest radikalın nötralize edilmesi.	7
2.3.	Peptit zincir oksidasyonuna ilişkin potansiyel yolak.	9
2.4.	Proteinlerin 4-HNE tarafından modifikasyonu.	10
2.5.	Mitokondride ROS üretimi.	14
3.1.	Yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeli yoluyla oluşturulan immobilizasyon modeli.	23
3.2.	Protein karbonil ölçümü çalışma prensibi.	26
3.3.	Protein karbonil analizi için uygulanan prosedür.	27
4.1.	İmmobilizasyonun soleus/VA'ya etkisi.	32
4.2.	İmmobilizasyonun hayvanların günlük yem tüketimine etkisi.	33
4.3.	İmmobilizasyonun hayvanların günlük su tüketimine etkisi.	33
4.4.	İmmobilizasyonun soleus kası protein karbonil düzeyleri üzerine etkisi.	34
4.5.	Soleus kasında AOPP'nin kloramin T eşdeğerliği.	35
4.6.	Soleus kasında AOPP'nin kloramin T eşdeğerliğinin örneklerdeki protein konsantrasyonuna oranı.	36
4.7.	Soleus kasında 4-HNE modifiye proteinleri düzeyi.	37
4.8.	Western Blot görüntüleri.	37

**TABLolar****Tablo**

2.1.	Başlıca reaktif oksijen ve nitrojen türleri.	5
4.1.	Deney hayvanları vücut ağırlıkları (VA).	31
4.2.	Soleus kas ağırlıklarının son ölçülen vücut ağırlıklarına oranları.	32
4.3.	Soleus kasında protein karbonil düzeyleri.	34
4.4.	Soleus kasında AOPP düzeyi.	35
4.5.	Soleus kasında 4-HNE optik yoğunluk yüzdeleri.	36

## 1. GİRİŞ

İskelet kasları, güç üretimi ve hareketi sağlamak gibi bilinen fonksiyonlarının yanında glisemik kontrol, metabolik genlerin regülasyonu ve metabolik homeostazın korunmasında oynadığı rol nedeniyle son yıllarda bir endokrin organ olarak kabul edilmektedir (1). Sağlıklı bir iskelet kas kütlelerinin varlığı organizmanın obezite, tip 2 diyabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çok sayıda kronik hastalıktan korunmasında ve hayat kalitesinin sürdürülebilmesinde kritik bir öneme sahiptir (2).

Uzun süreli yatak istirahati, denervasyon, ekstremitte immobilizasyonu gibi mekanik yükün ve nöral aktivasyonun azaldığı ya da tamamen ortadan kalktığı durumlar, protein yapım ve yıkımı arasındaki dengeyi olumsuz yönde etkileyerek iskelet kaslarında yapısal ve fonksiyonel bir bozulmaya yol açar. Bu durum, iskelet kas lif çapının azalması, kas kütlelerinde küçülme, kas kuvveti ve dayanıklılığında azalma ile karakterize iskelet kası atrofisi ile sonuçlanır (3). İskelet kasının kronik hastalıklardan korunmadaki önemi düşünüldüğünde immobilizasyon sonucu oluşan kas kütlelerindeki kayıplar yaşam kalitesini olumsuz etkileyen pek çok kronik hastalığın gelişimini tetikler, morbidite ve mortalitenin artmasına yol açar ve sağlık harcamalarına önemli bir yük getirir (4).

Literatürde, protein ve lipidler gibi hücre fonksiyonları açısından önemli yapılar da hasar meydana getiren oksidatif stresin immobilizasyon nedeniyle oluşan kas atrofisinde rol oynadığına ilişkin bazı kanıtlar vardır. Özellikle Kondo ve diğerlerinin immobilizasyon sırasında iskelet kasında artan oksidatif stresi inceledikleri çalışmalar oksidatif stres ve immobilizasyona bağlı iskelet kas atrofisi ilişkisini açıklayan öncül çalışmalardır (5-10). Nitekim, Kondo ve diğerleri immobilizasyon sonrası iskelet kasında hidroksil radikali üretiminin arttığı (10) ve immobilizasyonun iskelet kasında ksantin oksidaz ve serbest demirin serbest radikal üretimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (7-9).

Diğer yandan kullanmama atrofisine ilişkin çalışmalarda kullanılan hayvan türü ve modellerinin farklılığı iskelet kasında oluşan atrofinin düzeyini etkilediği gibi,



ortaya çıkan oksidatif stresin düzeyini de etkilemektedir. Deney hayvanlarında uygulanan kullanmama modellerinde yaygın olarak uygulanan arka bacakların kuyruktan asma yoluyla yüzleştirilmesi uzay uçuşları sırasında karşılaşılan mikrograviteyi taklit ederken, ekstremiteler veya tüm gövdenin alçılama yoluyla immobilize edilmesi çeşitli ortopedik/spor yaralanmaları sonucu oluşan kullanmamayı yansıtmaktadır. Keza tendon kesisi, sinir kesisi, mekanik ventilasyon diğer hayvan modelleri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsanlarda da mikrograviteyi taklit eden negatif eğimli yatak istirahati ya da bacağın dizden 60 derece bükülerek yüksüzleştirildiği askı modeli ve alçı uygulamaları karşılaşılan en yaygın modellerdir. Sonuç olarak bütün bu modellerin temel amacı kullanmamaya bağlı iskelet kası atrofisinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılarak kas atrofisinin ve böylece kas kütle ve fonksiyonunun korunmasına yönelik tedavi modalitelerinin geliştirilmesidir. Söz konusu çalışmalarda uygulanan modeller her ne kadar kas atrofisine yol açsa da insanda günlük yaşamda karşılaşılan kullanmamaya bağlı atrofiyi yeterli düzeyde taklit etmemektedir. Bu çerçevede atrofiye yol açan koşullar içerisinde en fazla karşılaşılan bir durum olan, sebebi ne olursa olsun uzun süreli yatak istirahatine maruz kalmak veya inaktif yaşam tarzı gibi kasa giden nöral uyarıların azaldığı koşulları yansıtan bir deneysel modelin eksikliği dikkati çekmektedir. Bu anlamda, Marmonti ve diğerlerinin 2017 yılında gerçekleştirdikleri yaşam alanı sınırlandırılmış hayvan modeli kullanmama koşullarında ortaya çıkan iskelet kas atrofisinde oksidatif stresin olası rolünün değerlendirmesi için önemli bir imkan sunmaktadır (11). Bu çalışma, uzun süreli yatak istirahatini en iyi şekilde taklit ettiği bildirilen bu modelde görülen iskelet kas atrofisinde oksidatif stres belirteçlerinin düzeylerini saptamayı hedeflemektedir.

### **1.1. Amaç ve Hipotezler**

#### **Araştırmanın amacı**

Bu çalışmanın amacı yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modelinin iskelet kasında oksidatif stres belirteçlerine etkisini incelemektir.

**Araştırma hipotezi**

Yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeli ile oluşturulan immobilizasyon iskelet kasında atrofiyle birlikte oksidatif hasar artışına neden olur.

Bu çalışmada yedi gün süresince yaşam alanı sınırlandırılmış immobilizasyon kafeslerinde barındırılan sıçanların soleus kas kütlesindeki değişim, protein karbonil, ileri protein oksidasyonu rnleri (AOPP) ve 4-hidroksinonenal(4-HNE) düzeyleri incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Normal koşullarda hücrede sürekli üretilen serbest radikaller ve serbest radikalleri nötrale ederek kararlı hale gelmesini sağlayan antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Bu denge durumu, radikallerin hücre içinde düşük konsantrasyonlarda tutularak sinyal iletimi, hücre proliferasyonu ve rejenerasyon gibi hücresel süreçlerde üstlendiği rol açısından kritiktir (12). Öte yandan immobilizasyon, radyasyon, çevre kirliliği, alkol ve sigara kullanımı gibi faktörler gerek serbest radikal üretiminin artması gerekse antioksidan savunma sisteminin baskılanması nedeniyle bu dengenin serbest radikaller lehine kaymasına neden olur. Böylece yüksek konsantrasyonlara ulaşan serbest radikaller hücrede önemli yapılara katılan lipid, protein, nükleik asit gibi molekülleri okside ederek hücrenin yapısal bütünlüğünün bozulmasına yol açar (13, 14). Bu durum oksidatif stres olarak tanımlanır ve hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürmesini engelleyerek hücre ölümüne kadar giden bir sürecin başlamasına yol açar (15).

### 2.1. Serbest Radikaller

Elektronlar, atomların orbital olarak bilinen bölgelerinde dönen negatif yüklü parçacıklardır. Her bir orbital zıt yönlerde dönen en fazla iki elektron bulundurabilir. Orbitalerde tek elektron bulunması durumu elektron eşleşmemesi olarak ifade edilir. Serbest radikaller, son yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, bağımsız olarak var olabilen bir molekül ya da atom olarak tanımlanmaktadır (16). Serbest radikaller, elektronlarını eşleyip kararlı hale ulaşmak için diğer bileşiklerle reaksiyona girme eğilimindedir. Bu durum, reaksiyona giren bileşiğin radikal haline gelmesi ve daha fazla radikalın üretildiği bir zincirleme reaksiyon kaskadının başlamasına yol açarak hücresel yapılara katılan moleküllerde hasara neden olur (17).

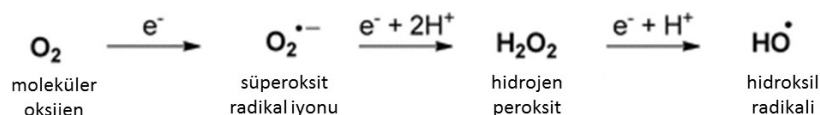
### 2.1.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

Serbest radikallerin büyük bir kısmı oksijen ve nitrojen kaynaklıdır. Radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi merkez atoma göre isimlendirilir. ROS ve RNS sıklıkla radikal anlamında kullanılsa da, radikal olmayan ancak organizmada kolaylıkla radikal türlerine dönüşebilen bileşikler de kapsamaktadır (16) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Başlıca reaktif oksijen ve nitrojen türleri.

	ROS		RNS	
<b>Radikaller</b>	Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$
	Hidroksil	$OH^{\bullet}$	Nitrojen dioksit	$NO_2^{\bullet}$
	Peroksil	$ROO^{\bullet}$		
	Alkoksil	$RO^{\bullet}$		
	Hidroperoksil	$HO_2^{\bullet}$		
	Lipid peroksil	$LOO^{\bullet}$		
<b>Nonradikaller</b>	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	Nitrik asit	$HNO_2$
	Singlet oksijen	$^1O_2$	Nitrosil katyonu	$NO^+$
	Hipokloröz asit	$HOCl$	Nitroksil anyonu	$NO^-$
	Hipobromöz asit	$HOBr$	Peroksinitrit	$ONOO^-$
	Ozon	$O_3$	Alkil peroksinitrit	$ROONO$

Organizmadaki serbest radikallerin en büyük kısmını ROS oluşturur. Başlıca reaktif oksijen türleri, süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ), RNS türleri ise nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ).

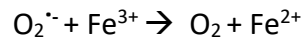


**Şekil 2.1.** Bazı reaktif oksijen türlerinin üretimi. Moleküler oksijenin  $e^-$  alarak indirgenmesi sonucunda basitçe süperoksit olarak tanımlanan süperoksit anyon

radikali açığa çıkar. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalini oluşturan reaksiyonlarda görev alır.

**Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ):** Süperoksit radikali, başta mitokondri olmak üzere çok sayıda biyokimyasal reaksiyonda moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu açığa çıkan negatif yüklü bir radikaldir. Radikal olmasına rağmen yüksek reaktiviteye sahip olmamakla birlikte, reaktivitesi yüksek bir radikal olan hidroksil radikalinin üretilmesinde rol oynar (18).

**Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ):** Hidrojen peroksit, radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Rölatif olarak uzun bir yarılanma ömrü vardır. Yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olmasına karşın, normal konsantrasyonlarda DNA veya lipidleri doğrudan okside edemez (19). Bu açıdan diğer reaktif oksijen türlerine kıyasla daha az reaktiftir. Ancak geçiş metallere katalizörlüğünde gerçekleşen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla yüksek düzeyde reaktif olan hidroksil radikalinin üretilmesinde önemli bir role sahiptir (20).



**Hidroksil Radikali ( $OH^{\cdot}$ ):** Hidroksil radikali protein, lipid, karbonhidrat, DNA ve RNA ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek bu moleküllerin biyolojik aktivitelerini yitirmelerine neden olur. Diğer tüm oksijen radikalleri içinde en reaktif olan tür olarak bilinmektedir (16).

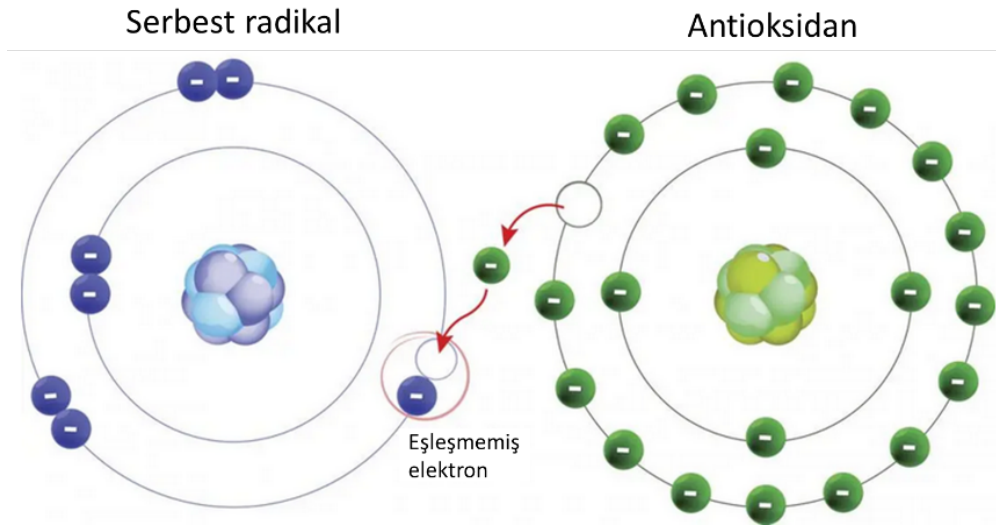
**Nitrik Oksit ( $NO^{\cdot}$ ):**  $NO^{\cdot}$ , dış orbitalindeki eşleşmemiş elektronundan dolayı serbest radikal özelliğine sahip bir moleküldür. Eşleşmemiş elektronun nitrojen atomu üzerinde yerleşik olmaması, bir diğer deyişle nitrojen ve oksijen atomları üzerinde delokalize olarak bulunması  $NO^{\cdot}$ 'in reaktivitesini baskılayıp stabilizasyonunu artırır. Nitrik oksit zayıf bir indirgeyici ajandır, oksijenle reaksiyona

girerek peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) üretmek için süperoksit ile çok hızlı bir reaksiyona girer (21).

**Peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ):** Süperoksitin, NO ile reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit DNA hasarına ve proteinlerin nitrasyonuna yol açabilen güçlü bir okside edici ajandır.

### 2.1.2. Antioksidan Savunma Sistemi

Hücrelerde oksidatif hasarın önlenmesi hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan bileşenlerden oluşan gelişmiş bir antioksidan savunma sistemi ile mümkündür. Başlıca enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) glutatyon redüktaz (GR)'dir. Glutatyon (GSH), ürik asit, vitamin E ve C, selenyum, ferritin,  $\beta$ -karoten, ürik asit ise önemli enzimatik olmayan antioksidanlardandır (22, 23).



**Şekil 2.2.** Antioksidanlar tarafından serbest radikalın nötralize edilmesi. Antioksidanlar, serbest radikallere elektron vererek serbest radikallerin kararlı hale geçmesini sağlar.

SOD, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene detoksifiye eder. Üç farklı izoformu vardır. Bunlardan bakır ve çinkoyu kofaktör olarak kullananlardan SOD1, hem sitoplazma hem de mitokondriyal zarlar arası boşlukta, SOD3 ise

ekstraselüler boşlukta aktivite gösterir. SOD2, manganezi kofaktör olarak kullanır ve mitokondriyal matrikste süperoksitin elimine edilmesinde rol alır (24).

Genel olarak,  $H_2O_2$ , peroksidaz ve katalaz olmak üzere iki temel antioksidan enzim tarafından elimine edilir. Peroksidazlar bu işlevini bir substratın başka bir substrata oksidasyonu yoluyla gerçekleştirir. Bunlardan GPX,  $H_2O_2$ 'in suya indirgenmesini katalize ederken substrat olarak iki indirgenmiş GSH molekülü kullanılır. GSH, yapısındaki tiyol grubu (-SH) sayesinde serbest radikallerin elimine edildiği reaksiyonlarda hidrojen donörü olarak görev alır ve glutatyon disülfite (GSSG) yükseltgenir. Hücrenin reaktif oksijen türlerini nötralize etme kapasitesi açısından GSH:GSSG oranı önemli bir belirteçtir. Öyle ki, dinlenik koşullarda GSH:GSSG oranı 100:1'in üzerindeyken çeşitli oksidatif stres modellerinde bu oranın 10:1 ve 1:1 oranında olduğu bildirilmiştir (25). Hücrede reaktiflerin birikimi ve neden oldukları hasarın önlenmesi, antioksidan sistemin savunma kapasitesiyle doğrudan ilişkilidir. Bu bağlamda GR enzimi GSSG'nin, başka bir reaksiyonda antioksidan olarak kullanılmak üzere GSH'a indirgenmesinde önemli bir rol üstlenir (26, 27).

Katalazlar, GPX gibi  $H_2O_2$ 'i suya dönüştürerek hücreyi oksidatif stresin zararlı etkilerinden korumasında görevlidir. Hücrede temel olarak peroksisomda bulunur (23).

## **2.2. Oksidatif Stres ve Radikallerin Biyolojik Hedefleri**

Oksidatif stres sonucunda protein, lipid, DNA, karbonhidrat gibi biyomoleküller okside olması biyokimyasal yapılarının bozulmasına ve fonksiyonlarını kaybetmelerine yol açar. Oksidatif stresi değerlendirmek için en yaygın yaklaşımın, oksidatif strese duyarlı, rölatif olarak uzun bir yarılanma ömrü olan bir moleküldeki artışı veya azalmayı ölçmek olduğu belirtilmiştir (16).

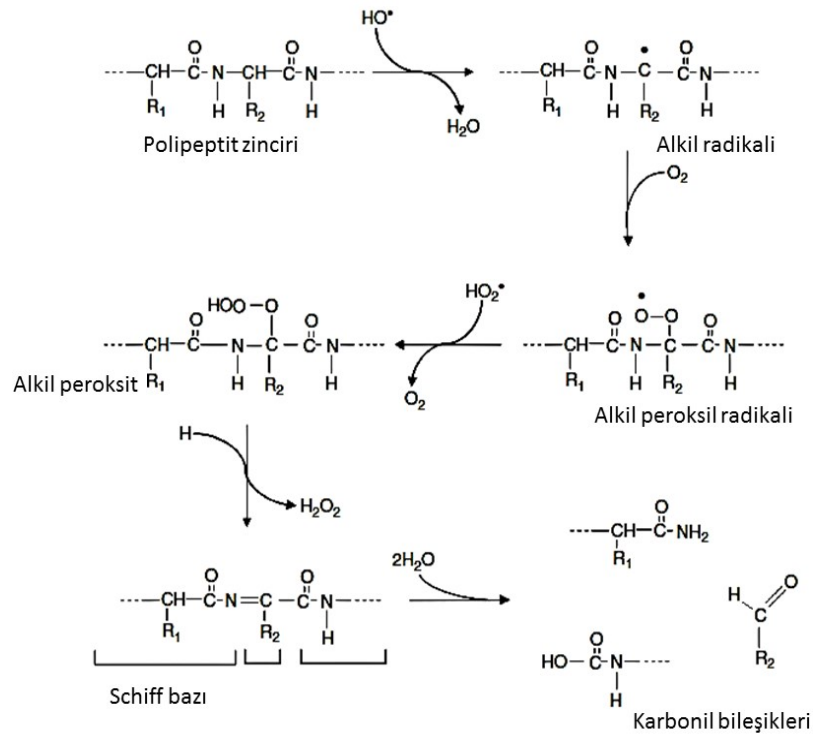
ROS hasarına özgü oluşan protein karbonil ve ileri protein oksidasyonu (AOPP) protein oksidasyonunu, malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE) lipid peroksidasyonunu, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OH-dG) ise DNA

oksidasyonunu göstermekte olup, araştırmalarda yaygın olarak kullanılan oksidatif stres belirteçlerindedir (28).

### 2.2.1. Protein Oksidasyonu

Proteinler, hem reaktif türler hem de reaktif türlerin lipid ve protein gibi biyolojik yapıları okside etmesiyle açığa çıkan sekonder ürünler tarafından okside olabilir (29). Protein karbonil gruplarının oluşumu, nitrotirozin (NT), AOPP oluşumu ve proteine ait tiyol gruplarının kaybı oksidatif hasar sonucu proteinin yapısal değişikliğe uğradığını gösterir (30).

- 1) Protein Karbonil Gruplarının Oluşumu: Proteinlerin yapısında görülen karbonil grupları çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşabilir. Protein ana yapısının hidrolizi: OH<sup>•</sup> radikali, polipeptit omurgasındaki herhangi bir aminoasitin α-karbon atomundan hidrojen atomunun ayrılmasına neden olur. Bu oksidatif hasar, karbon merkezli radikal oluşumunu takiben peptit bağının kırılarak karbonil türevlerinin açığa çıkmasıyla sonuçlanabilir (şekil 2.3) (29, 31).



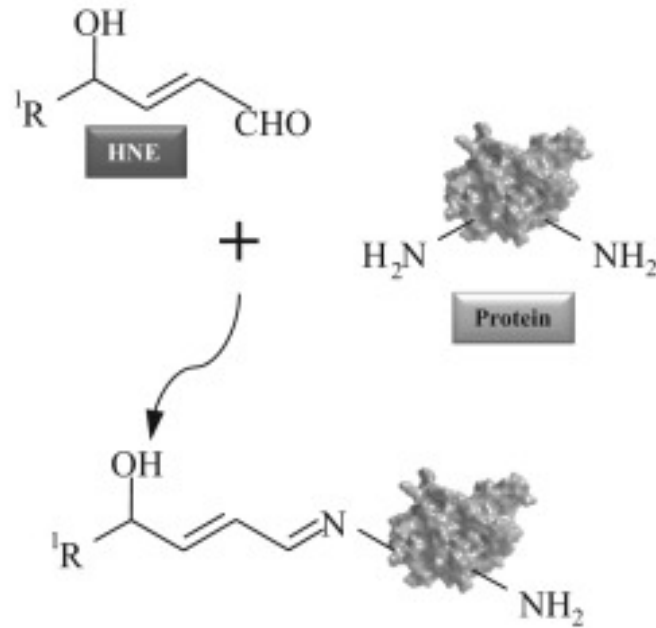
**Şekil 2.3.** Peptit zincir oksidasyonuna ilişkin potansiyel yolak. OH<sup>•</sup> radikali, polipeptit zincirindeki bir aminoasitin α-karbon atomundan hidrojenin ayrılarak alkil, alkil peroksil gibi radikallerin üretilmesine yol açan bir



reaksiyon zinciri başlatır. Peptit zinciri oksidasyonu, amino asit dizilerinin doğrudan aldehit, keton türevlerine dönüşmesiyle veya peptit bağının kırılması ile sonuçlanabilir (32).

- 2) Amino asit yan zincirinin doğrudan oksidasyonu: Fenton reaksiyonu sonucu ortaya çıkan OH<sup>•</sup> radikali prolin, arjinin, lizin, treonin amino asitlerinin yan zincirlerini, aldehit veya keton türevlerine okside eder (33).

Sekonder modifikasyon reaksiyonları: Lipid peroksidasyon ürünleri olan 4-HNE, 2-propenal, MDA gibi lipid peroksidasyon ürünleri histidin, sistein ve lizin dizilerine atak yapabilir (Şekil 2.4). Ayrıca indirgenen glukoz veya bu glukozun oksidatif ürünlerinin proteinlerdeki lizin dizileri ile reaksiyonu karbonil türevlerinin oluşmasına neden olur (31).



**Şekil 2.4.** Proteinlerin 4-HNE tarafından modifikasyonu (34).

Protein karbonilasyonu, proteinlerin oksidatif modifikasyonu sonucu aldehid ve keton gibi karbonil gruplarının oluşması ile karakterize olup, geri dönüşümsüz bir post-translasyonel modifikasyondur (29). Oluşan karbonil grupları proteinin doğru katlanmasını olumsuz etkileyerek biyolojik fonksiyonunu kaybetmesine neden olur. Protein karbonilasyonu, Alzheimer, diyabetes mellitus, sepsis, kistik fibrozis, kronik

kalp ve böbrek yetmezliği gibi çok sayıda hastalıkla ilişkili olan, biyokimyasal ve analitik teknikler kullanılarak ölçülebilen bir oksidatif stres belirteci olarak kabul edilmektedir (35). Karbonillenmiş proteinler, onarılamadığı için eğer elimine edilmezse hücrede birikerek hücrenin ölümünü beraberinde getirebilir (36).

### **İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu (AOPP):**

Yüksek reaktivitesi sebebiyle hipokloröz asit (HOCl) hücrelerde birikemez ve saptanamaz. Bu nedenle HOCl çeşitli oksidatif reaksiyonlara katılarak kloramin olarak bilinen bir grup oksidanın üretilmesinde rol alır (37). HOCl ve kloraminler gibi klorinlenmiş oksidanların proteinlerle reaksiyonu sonucu AOPP oluşur (38).

AOPP, pek çok hastalıkta protein oksidatif hasarını gösteren duyarlı bir belirteçtir (31). AOPP'nin moleküler kompozisyonuna dair kabul edilen belirli bir sınıflandırma mevcut olmadığından oksidatif stresin genel bir biyobelirteci olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmiştir (39). Nitekim AOPP düzeylerinin ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin ve protein oksidasyon belirteci olan ditirozin ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (40).

### **Tiyol Gruplarının Oksidasyonu:**

Serbest radikaller tiyol grubu içeren aminoasitleri okside ederek tiyil (-S) radikali oluşumuna yol açar. Bu durum proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna neden olabilir (41). Oksidatif hasar sonucu oluşan disülfidler ve oksiasitler, protein oksidasyonunun en erken gerçekleşen belirtilerinden biridir (42).

### **Nitrotirozin Oluşumu:**

Nitrotirozin protein oksidasyonuna yol açan,  $O_2^{\cdot-}$  ve  $NO^{\cdot}$  'e kıyasla çok daha reaktif bir türdür (42). ONOO'nun tirozini okside etmesi sonucu stabil bir ürün olan nitrotirozin açığa çıkar (43).

### 2.2.2. Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranları ve organeller yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) içerir. Bu yağ asitleri yapılarında iki veya daha fazla çift bağ içerirler. Yağ asitlerinin yapısındaki karbon bağı sayısının artması onları oksidatif hasara karşı daha duyarlı hale getirir. Nitekim, doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerine kıyasla ÇDYA oksidatif hasara çok daha yatkındır. Hücre membranının fosfolipid yapısına katılan ÇDYA'ların radikal hasarına yatkın olması membran yapısı ve fonksiyonu açısından önemlidir. Biyolojik membranların oksidatif hasarı membran geçirgenliğinin bozulması ve hücre ölümüne yol açar (15).

Lipid peroksidasyonu üç tepkimeden meydana gelir. Başlangıç aşamasında radikallerin atağı sonucu ÇDYA yapısından bir hidrojen atomu ayrılır ve ÇDYA bir karbon radikale ( $L^{\cdot}$ ) dönüşür. Gelişme aşaması olarak isimlendirilen ikinci aşamada  $L^{\cdot}$  ile moleküler oksijenin reaksiyonu sonucu peroksil radikali ( $LOO^{\cdot}$ ) oluşur.  $LOO^{\cdot}$  başka bir lipid molekülüne atak yaparak lipid hidroperokside ( $LOOH$ ) dönüşürken, atak yaptığı lipid molekülü başka bir radikale dönüşür. Bu reaksiyon üçüncü aşama olan sonlandırma aşamasına kadar yeni radikallerinin oluştuğu bir kaskad şeklinde devam eder (44). Sonlandırma aşamasında, E vitamini gibi bir antioksidan  $LOO^{\cdot}$  türlerine bir hidrojen atomu vererek tepkimeyi bitirebilir veya diğer aşamalarda oluşan radikaller birbirleriyle tepkimeye girerek radikal olmayan son ürünlere dönüşür (15).  $LOOH$ , lipid peroksidasyonu sonucu oluşan primer ürünler olup bir antioksidan molekül tarafından nötralize edilmezse MDA, 4-HNE ve lipid epoksid gibi reaktif türlere parçalanır. 4-HNE oldukça toksik bir radikal olup tiyol ve amino grupları ile hızlı bir şekilde reaksiyona girmektedir (45).

### 2.3. Serbest Radikallerin İskelet Kasları Açısından Fizyolojik Rolü

Moleküler oksijen, tüm aerobik organizmalar için hücresel solunumun temel molekülü olarak elzem bir rol üstlenirken, oksijenin indirgenmesi sonucu açığa çıkan oksijen türevleri, hücreler için oldukça toksik olabilmektedir. İskelet kasları, kas kasılmasının verimli bir şekilde gerçekleşebilmesi için yüksek miktarda oksijene gereksinim duyması ve mitokondri yönünden oldukça zengin olması sebebiyle

serbest radikallerin yoğun olarak üretildiği en önemli organlardan biridir. Bu nedenle 1980'li yıllara kadar egzersizle artan radikal üretiminin iskelet kas hasarına neden olduğu, kas lifleri için toksik olduğu üzerinde durmuştur. Ancak 2000'li yıllarda radikallerin indirgenme-yükseltgenme tepkimelerini kapsayan redoks sinyal yollarını düzenlemek, iskelet kaslarının egzersize adaptasyonunu sağlamak gibi önemli roller üstlendiği araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır (46).

Radikaller, enzim aktivitesini, membran transportunu ve gen transkripsiyonunu değiştirerek iskelet kas liflerinin yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilir (47). Örneğin antioksidan yanıtın ana düzenleyicisi olan nükleer eritroid 2 ilişkili faktör (Nrf2) normal koşullarda endojen inhibitörü olan kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (Keap1)'e bağlıyken (48), artan ROS'un etkisiyle Keap1'den ayrılarak çekirdeğe transloke olur. Nrf2, antioksidan yanıt elementine (ARE) bağlanarak bir dizi antioksidan genin ekspresyonunu kontrol etmede ana transkripsiyon faktörü olarak görev alır (49, 50). Bu yolla oksidatif stresin, Nrf2 gen ekspresyonunu ve transkripsiyonel aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir (51-55). Normal koşullarda iskelet kas liflerinde ROS düşük düzeylerde üretilir. Sağlıklı bir iskelet kasında ROS, çok sayıda sinyal yolağında yer alır.

## **2.4. İmmobilizasyon Sürecinde Oksidatif Stres**

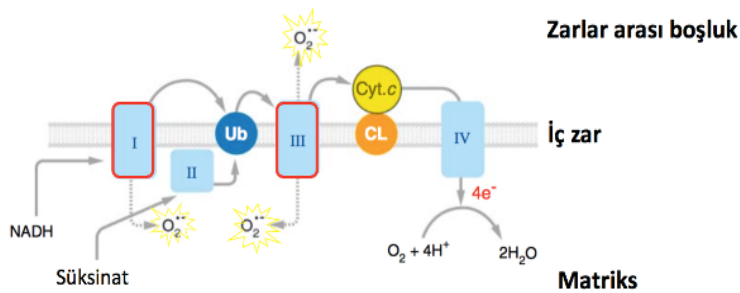
### **2.4.1. İmmobilizasyon Sürecinde ROS Üretiminden Sorumlu Mekanizmalar**

ROS, hücrenin başta mitokondri, sitoplazma, endoplazmik retikulum olmak üzere tüm kompartmanlarında hücrel aktivite için doğal bir sonucu olarak açığa çıkmaktadır (56). İmmobilizasyon ksantin oksidaz, NADPH oksidaz (NOX) ve mitokondriyi içeren üç farklı mekanizma ile ROS üretiminin artmasına neden olmaktadır (57-61).

## Mitokondri

Hücresin temel enerji üretim merkezi olan mitokondri; matriks, iç membran, dış membran ve membranlar arası kompartmandan oluşur (62). Glukoz, serbest yağ asitleri gibi substratların Krebs döngüsünde metabolize olması ile açığa çıkan elektronlar, mitokondri iç zarında bulunan elektron transport zincirine (ETZ) taşınır ve oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimi gerçekleşir. Elektronlar ETZ'nin kompleksleri boyunca transfer edilirken hidrojen iyonları matriksten zarlar arası boşluğa pompalanır. Komplekslerden transfer edilen elektronlar ise kompleks IV'te son elektron alıcısı olarak görev yapan moleküler oksijene ( $O_2$ ) aktarılır ve hidrojen iyonu ile reaksiyona girerek  $H_2O$  oluşturur. Zarlar arası boşluktaki hidrojen iyon konsantrasyonundaki artış mitokondrinin iç ve dış zarları arasında bir gradient farkı oluşturur. Bu gradiyent farkından oluşan enerjiyi kullanan kompleks V, ATP sentezleyen bir enzim olup, ADP'den ATP üretimini gerçekleştirir.

Mitokondri, hücre fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için gerekli enerjiyi sağlamanın yanı sıra, reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma arasındaki redoks homeostazının düzenlenmesinde kritik rol almaktadır (63). Oldukça verimli bir sistem olmasına karşın, oksidatif fosforilasyon sırasında ETZ komplekslerinden elektronların bir kısmı kompleksler arasında transfer edilemez ve elektron kaçakları oluşabilir (Şekil 2.4). Örneğin, übikinon tarafından kompleks I ve II'den alınan elektronlar kompleks III'e ve ardından sitokrom c'ye transfer edilirken oluşan elektron kaçakları ortamdaki  $O_2$  tarafından alındığında  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ve  $OH^{\cdot}$  gibi ROS oluşur (64).



Şekil.2.5. Mitokondride ROS üretimi.

İmmobilizasyon sürecinde hücrede artan ROS'un büyük bir kısmından mitokondrinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (57, 59, 61, 65). On dört gün süresince alçılama yoluyla immobilize edilen sıçanların plantaris ve soleus kaslarında mitokondriden salınan  $H_2O_2$  %100 artmıştır (58).

İmmobilizasyon sürecinde mitokondride ROS artışından hangi mekanizmanın sorumlu olduğu tam olarak aydınlatılmamasına rağmen,  $Ca^{+2}$  homeostazındaki bozulmanın tetiklediği mitokondriyal disfonksiyonun ROS artışına neden olabilecek mekanizmalardan biri olabileceği belirtilmiştir. İmmobilizasyona bağlı olarak sitoplazmada  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artması,  $Ca^{+2}$ 'un mitokondriye akın etmesine ve mitokondriyal depolarizasyona yol açar (66).  $Ca^{+2}$ , sitrik asit döngüsü aktivitesini  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaz gibi ROS üreten enzimleri aktive eder (67).

### **Ksantin oksidaz**

İmmobilizasyon gibi oksidatif stresin arttığı koşullarda adenin ve guaninin metabolize olmasıyla oluşan ksantin, ksantin oksidaz ile oksitlenerek ekstrasellüler alanda süperoksit radikallerinin açığa çıkmasına sebep olur (68-70). Ksantin oksidaz enzim aktivitesindeki artış oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilmektedir. Hayvanda iskelet kasında kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme ve mekanik ventilasyon modellerinin uygulandığı çalışmalar iskelet kas liflerinde ksantin oksidaz enzim aktivitesinin arttığını göstermiştir (9, 61, 71, 72). Ksantin oksidazın oksipurinol ve allopurinol gibi farmakolojik ajanlarla inhibisyonu ise immobilizasyonun sebep olduğu kas atrofisini azaltmış (71) ve kontraktıl fonksiyonların korunmasını sağlamıştır (61).

### **NADPH Oksidaz**

İskelet kaslarında ROS üretiminden sorumlu başka bir mekanizma NOX enzim ailesidir (73). Transvers tübül, mitokondri, sarkolemma ve sarkoplazmik retikulumda (74) aktivite gösteren NOX, moleküler oksijeni indirgeyerek  $O_2^-$  radikallerini üretir (75). İmmobilizasyon sürecinde NOX aktivitesinin arttığı bilinmektedir (57, 76).

#### **2.4.2. Oksidatif Stresin İmmobilizasyona Bağlı Kronik Hastalıkların Gelişimindeki Rolü**

İmmobilizasyon koşullarında, ROS üretiminin artması ve antioksidan savunma sisteminin baskılanması sebebiyle kontrolü sağlanamayan oksidatif stres hücrelerdeki önemli yapıların hasar görmesine ve fonksiyon kaybına neden olur.

Son yıllarda oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıkların gelişimindeki temel etkenlerden biri olarak değerlendirilmektedir (77). LDL-kolesterolünün ROS tarafından okside olması ateroskleroz gelişiminde rol oynamaktadır (78). Farelerde altı haftalık immobilizasyon sonucu endotelde NOX enzim aktivitesi, O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretimi ve lipid peroksidasyonu artmış, endotelial fonksiyonlar bozularak aterosklerotik lezyon gelişmiştir (79). Başka bir çalışmada ise, sıçanlarda immobilizasyon sonucu artan oksidatif stres sistolik hipertansiyon ve endotelial disfonksiyonun oluşmasına neden olmuştur (80).

Çok sayıda çalışma bulguları diyabet hastalarında oksidatif stresin arttığı yönündedir (81-85). İskelet kaslarının insan vücut ağırlığının yaklaşık %40'ını oluşturduğu ve metabolik homeostazda oynadığı rol göz önüne alındığında, dinlenim kan glukozunun %80'inin hücre içerisine alınmasından sorumlu olan kas kütlelerinde azalmanın tip 2 diyabet oluşumu için ciddi bir risk oluşturacağı aşikardır (86).

Diğer yandan, hem tip 1 hem de tip 2 diyabetli hastalarda dolaşımda ve idrarda lipid peroksidasyonunu gösteren F<sub>2</sub>-izoprostan ürünlerinin arttığı bilinmektedir (87-89). Ayrıca, bu belirteç kan glukoz seviyeleri ile paralellik göstermektedir (88). Bu bulgulara ek olarak, tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarda protein karbonilasyonunun artması da oksidatif stres geliştiğini destekleyen bir kanıttır (90, 91). Bununla birlikte, fiziksel aktivitenin azaldığı durumlar ve redoks homeostazının bozulmasına bağlı olarak oksidatif stresin, insülin sinyalini inhibe eden bir faktör olabileceği vurgulanmaktadır (92). Oksidatif stres tarafından insülin reseptör substratı 1/2'nin (IRS-1/2) yapısındaki serin amino asitinin fosforilasyonu

IRS-1/2'nin degrade olmasına ve tirozin fosforilasyonunun engellenerek insülin sinyalinin baskılanmasına neden olmaktadır (93).

Oksidatif stres replikasyon sırasında DNA'nın hasar görmesini, mutasyonları ve kanser gelişimini tetikler (94, 95). OH<sup>•</sup> radikalinin, guanin bazını okside etmesi sonucu açığa çıkan 8-OH-dG ürünleri, replikasyon sırasında adenin bazı ile eşleşerek mutasyonların oluşmasına yol açabilir (96, 97). Kanser ve tümör gelişimi ile ilişkili olan 8-OH-dG ürünlerinin fiziksel aktivite düzeyleri ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (98). Bunların yanında, DNA'yı da içeren pek çok makromolekülün ROS tarafından okside olması ve birikmesi yaşlanma sürecinde fizyolojik fonksiyon kaybı ve dejeneratif hastalıkların gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır (99). Yaşlanma sürecinde oksidatif stresin telomer kısalmasına neden olarak yaşlanma sürecini hızlandırdığı bilinmektedir (100, 101). Ayrıca immobilizasyona bağlı olarak makromoleküllerin oksidatif hasarı sonucu bilişsel fonksiyonlarda gerileme meydana gelirken, immobilizasyon sonrası tek seanslık bir egzersizin bile makromolekül hasarını gidererek bilişsel fonksiyonların normale dönmesini sağladığı bildirilmiştir (102).

Bu bulgular immobilizasyonun sebep olduğu artan kronik hastalık riskinde oksidatif stresin olumsuz etkilerini ortaya koymakla birlikte, hareketsiz yaşam tarzına bağlı patolojilerin ve kronik hastalıkların oluşmasında oksidatif stresin önemine vurgu yapmaktadır.

## **2.5. İmmobilizasyon Modellerinde Oksidatif Stres**

Uzun süreli yatak istirahati ve ekstremitte immobilizasyonu klinikte sıkça karşılaşılan, hasta hareketlerinin ve dolayısıyla kas aktivitesinin kısmen ya da neredeyse tamamen kısıtlandığı koşullardır. İnsanlarda, immobilizasyonun sebep olduğu patofizyolojilerden sorumlu mekanizmaları araştırmak kas biyopsisi gibi invaziv prosedürleri gerektirir. Ayrıca, yatak istirahati çalışmaları fizyolojik fonksiyonlarda gerileme ve sağlık riski teşkil etmesi sebebiyle çok fazla tercih edilmemektedir. İmmobilizasyonun neden olduğu hücresel düzeydeki süreçleri



araştıran çalışmaların büyük çoğunluğu bu koşulları taklit eden çeşitli hayvan modelleri ile gerçekleştirilmektedir (103). Bu modellerden en yaygın kullanılanları alçılama, kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme, denervasyon, mekanik ventilasyon yoluyla gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemleridir (104).

Deney hayvanlarında alçılama yolu ile ekstremitte immobilizasyonu insanlardaki alçılama ile immobilizasyona karşılık gelen bir model olup hayvanlarda bilateral veya lateral olarak bacağın immobilize edilmesi yoluyla gerçekleştirilebilmektedir (105, 106). Immobilizasyon sırasında iskelet kasında oksidatif stres düzeyini araştıran Kondo ve diğerleri, on dört gün süresince alçılama yoluyla oluşturdukları immobilizasyon modeliyle sıçanların soleus kasında GSH ve lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA seviyelerini gösteren tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında bir antioksidan olan GSH'ın oksidatif stres koşullarında GSSG'ye yükseltgendiği ve hücredeki konsantrasyonunun %34 oranında azaldığını göstermişlerdir (105, 106). TBARS ise (107) alçılama yoluyla oluşturulan immobilizasyon modelinde yavaş oksidatif bir kas olan soleus kasında kontrol grubuna kıyasla %37 artmıştır (105). Benzer şekilde on dört gün alçılanarak immobilize edilen farelerin soleus kaslarında 4-HNE düzeylerinin artması immobilizasyon sürecinde oksidatif hasarı işaret etmektedir (58).

İmmobilizasyon sürecinde artan ROS, proteinleri okside ederek sentez sürecindeki katlanma hatalarına, kimyasal yapılarının bozulmasına ve fonksiyonel kayıplara sebep olmaktadır. ROS'un  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  gibi metaller katalizörlüğünde proteinler ile girdiği reaksiyonlar protein yapısını oluşturan aminoasitlerin karbonil türevlerine dönüşmesi ile sonuçlanır (108). Alçılama benzeri bir yöntem olarak geliştirilen her iki bacağın da sabitleyici bir aparat yoluyla on dört gün immobilize edildiği başka bir çalışmada ise soleus ve gastroknemius kasında immobilizasyon grubunda protein karbonil ve TBARS düzeylerinin arttığı ve GSH düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (106).

Alçılama yöntemine ek olarak uzayan yatak istirahati ve insanda uzay uçuşunu taklit eden, kemirgenlerin bir askı ile kuyruktan asılarak arka bacaklardaki kas aktivitesinin önemli derecede azaltıldığı kuyruktan asma ile yüksüzleştirme yolu ile immobilizasyon modeli de yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Bu model ile on dört gün sonunda sıçanların soleus kaslarında MDA düzeyleri artmış ve GSH düzeyi azalmıştır (109). Benzer şekilde on dört gün kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme uygulanan başka çalışmalarda hayvanların soleus kasında protein karbonil düzeyinin arttığı bildirilmiştir (110, 111). Farklı özellikteki kasların yüksüzleştirme uygulaması sonucu oksidatif strese yanıtı farklı olabilmektedir. Hızlı kas liflerinden zengin ekstansör digitorum longus (EDL), gastroknemius ve tibialis anterior kaslarında anlamlı bir değişiklik olmazken, yavaş kas liflerinden zengin soleus kasındaki TBARS düzeyleri artmıştır (112).

ROS'un hücre yapılarına yönelik olumsuz etkilerinin engellenebilmesi için antioksidan sistem tarafından suya yükseltgenerek elimine edilmesi gerekir. Normal şartlarda antioksidan sistem ve ROS üretimi bir denge halindedir. Ancak immobilizasyon sürecinde ROS düzeylerindeki artış bu dengeyi bozar ve bu duruma yanıt olarak bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinde değişiklik meydana gelir (46).

Hücrede üretilen  $O_2^{\cdot-}$  radikalleri ilk önce antioksidan bir enzim olan SOD tarafından  $H_2O_2$ 'e dönüştürülür. Yirmi sekiz gün süresince kuyruktan asma yoluyla uygulanan immobilizasyon modeliyle soleus kasında SOD'nin sitoplazmaya özgü formu olan Cu-Zn-SOD enzim aktivitesinin artması,  $O_2^{\cdot-}$  anyonlarının  $H_2O_2$ 'e elimine edilmesini katalize ettiği için immobilize edilen grupta  $H_2O_2$  düzeyleri artmıştır (113).  $H_2O_2$ 'in suya indirgenmesinde GPX (114) ve CAT'ın (115) görev aldığı bilinmektedir. Ancak  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılması hücrenin oksidatif stresle başa çıkabilmesi açısından son derece kritiktir. Nitekim, elimine edilememesi durumunda  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$ , geçiş metallere katalizör olduğunda reaksiyona girerek çok daha toksik olan  $OH^{\cdot}$  radikalının oluşumuna neden olmaktadır (116). Böylece bu çalışma bulguları immobilizasyon sonucu CAT ve GPX aktivitelerinin azalması artan  $H_2O_2$ 'nin

uzaklaştırılmayıp ve  $O_2^{\cdot-}$  ile reaksiyona girerek  $OH^{\cdot}$  radikalinin artmış olabileceğini düşündürmektedir.

Kuyruktan asmayla yüksüzleştirme yoluyla immobilizasyona benzer şekilde, alçılama yolu ile oluşturan immobilizasyona yanıtta da SOD aktivitesinde artış olmasına karşın GPX aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır (6, 9, 117). CAT aktivitesi ise immobilizasyon koşullarının uzaması durumunda değişmektedir; yedi günlük alçılama modelinde CAT aktivitesinde bir değişiklik olmamışken (6), sekizinci ve on ikinci günlerde bu enzim aktivitesinde artış bildirilmiştir (9, 117). Bu durum hücrede  $H_2O_2$  ve  $OH^{\cdot}$  konsantrasyonlarının immobilizasyonun ilk günlerinde artmış olabileceğini işaret etmektedir.

İmmobilizasyon modellerindeki yöntemsel farklılıkların, oksidasyon belirteçleri ve antioksidan enzim yanıtlarındaki farklılığa yol açmış olabileceği öne sürülmüştür (110). Örneğin, alçılama yöntemiyle uygulanan immobilizasyonda bacak kaslarının eksantrik/konsantrik kasılarak hareket etmesi mümkün olmayıp kaslar izometrik olarak kasılabilmektedir. Öte yandan kuyruktan asma yoluyla oluşturulan yüksüzleştirme modelinde arka bacak kaslarının herhangi bir dirence karşı kuvvet üretmesi mümkün olmamaktadır. Kullanmama sürecinde arka bacağın pozisyonunun kasa binen mekanik yüke ve kas kontraksiyonuna etki ederek farklı oksidasyon ve degradasyon yollarını etkileyebileceği bildirilmiştir (118, 119). Bu sebeple araştırmak istenilen klinik koşulu (uzun dönem yatak istirahati, immobilizasyon, uzay uçuşu vb.) en iyi yansıtan hayvan modelinin seçilmesi son derece önemli bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır.

Alçılama ya da kuyruktan asma yoluyla gerçekleştirilen yüksüzleştirme modellerinin kas aktivitesinin büyük oranda azalmasını sağlamasının yanı sıra, yatak istirahatini taklit etmede yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeli ile immobilizasyon, insanlardaki yatak istirahatini alçılama ve yüksüzleştirme yoluyla immobilizasyon modellerine göre daha iyi taklit eden bir hayvan modelidir. Bu modelde sıçanlar, standart kafes yerine yaşam alanı sınırlandırılmış kafeslerde barındırılmakta ve bu sayede fiziksel aktivite düzeyleri

azaltılmaktadır. Literatürde uzun süreli yatak istirahati (120), alçılama (8-10, 106), kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme (109, 110, 112) ve mekanik ventilasyon (121, 122) gibi çeşitli modellerin kullanıldığı araştırmalar, immobilizasyonun artan serbest radikallere ve bozulan redoks sinyaline etkisini ortaya koymuştur. Ancak literatürde yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modelinin pek çok kronik hastalığın gelişiminden sorumlu olan iskelet kasında oksidatif strese etkisine ilişkin bir bulgu bulunmamakta olup, bu tez çalışmasının araştırma konusunu oluşturmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırma Grubu

Bu çalışmada, daha önce “Tüm Vücut Titreşiminin Kullanmamaya Bağlı İskelet Kası Atrofisinin Önlenmesindeki Rolü” başlıklı TÜBİTAK 1001 projesi için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2017/61-08 sayılı etik kurul onayı verilmiş hayvanlardan izole edilip saklanmış kas dokuları kullanılmış olup, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 28.09.2021 tarih, 2021/07-15 karar numarası ile bu çalışma için ilgili yönetmelik gereği Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınmasına gerek olmadığı bildirilmiştir.

Vücut ağırlıkları 200-250gr olan on altı 3-4 aylık erkek Wistar Albino sıçan, yedi gün süreyle 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda, yaklaşık 22°C oda sıcaklığı ve %50-60 nem içeren ortamda barındırılarak deney protokolü süresince bulunacakları ortama adapte olmaları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde hayvanlar, günlük beslenme gereksinimlerini karşılamaları için yem ve su erişiminde serbest bırakılmıştır. Bir haftalık adaptasyon sürecinden sonra deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

##### 3.1.1. Deney Grupları

Sıçanlar, bir haftalık hayvan barınağına uyum sürecinden sonra kontrol (K) ve yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeliyle uygulanan immobilizasyon (İ) olmak üzere iki gruba rastgele atanmıştır. Deney protokolü tamamlandığında günde 8 hayvan ötenazi edilebilmesi için, sıçanlar protokole, günde her gruptan iki hayvan olacak şekilde sırayla eklenmiştir.

**1- Kontrol grubu (K; n=8):** Bu grup hayvanlar, hiçbir uygulama yapılmaksızın standart sıçan kafeslerinde her kafeste iki hayvan olacak şekilde 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda barındırılmıştır. Standart sıçan yemiyle immobilizasyon grubuyla eş miktarda olacak şekilde beslenmişler ve suya erişimleri

serbest bırakılmıştır. Hayvanlara, yedi günlük deney protokolünün tamamlanmasının ardından sekizinci günde ötenazi yapılarak soleus kasları izole edilmiştir.

**2- İmmobilizasyon (İ; n=8):** İmmobilizasyonun oksidatif hasar belirteçlerine etkisinin belirlenmesi için bu gruptaki hayvanlar, yedi gün süresince yaşam alanı sınırlandırılmış kafeslerde barındırılarak immobilize edilmiştir. Hayvanlar deney protokolünün sekizinci gününde ötenazi edilerek soleus kasları izole edilmiştir.

İmmobilizasyon grubundaki hayvanların günlük yem tüketimleri deney protokolleri başlamadan önce ön çalışma ile belirlenmiş ve günlük 25-30 gr arasında yem tükettikleri belirlenmiştir. Buna göre her kafese günlük yeterli miktarda standart sıçan yemi konmuş ve yem tüketimleri günlük takip edilerek kaydedilmiştir.

### 3.2. Deney Protokolü

#### 3.2.1. İmmobilizasyon Modeli

Bu çalışmada, daha önce iskelet kası atrofisine yol açtığını belirlediğimiz yaşam alanı sınırlandırılmış kafes yoluyla oluşturulan immobilizasyon modeli uygulanmıştır (123).



**Şekil 3.1.** Yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeli yoluyla oluşturulan immobilizasyon modeli. Bu modelde sıçanlar, standart sıçan kafesi yerine 12x12x8cm boyutlarında özel olarak üretilmiş kafeslerde barındırılmıştır.

Bu model, temel olarak hayvanların hareketlerini sınırlamak ve fiziksel stres oluşturmada daha küçük bir alanda yaşamalarına dayanmaktadır. Marmonti ve diğerlerinin (124) bu immobilizasyon modelini farklı sürelerde uyguladıkları çalışmada 1, 4, 8 ve 14 gün sonunda alınan plazma örneklerinde kortikosteron düzeyleri ile 7 ve 14'üncü gün belirlenen adrenal ağırlıkları sıçanlarda kontrol grubuna göre farklı bulunmamıştır. Laboratuvarımızda da daha önce bu modelle tamamlamış olduğumuz Tübitak 1001 projesinde plazma kortikosteron düzeyleri ya da adrenal bezi ağırlıklarında fark gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu modelin glukokortikoid düzeylerini artırmadan kas kütle ve lif enine kesit alanında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (124). Buna göre immobilize edilen sıçanlar deney protokolü süresince standart sıçan kafesi yerine, kafes boyutları standart kafesin toplam hacminde yaklaşık %80'lik bir azalmaya karşılık gelen bir hacimde (12x12x8cm) üretilmiş kafeslerde barındırılmış, su ve sıçan yemine ulaşım standart kafeslerde olduğu gibi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.)

### **3.2.2. Ötenazi ve Doku İzolasyonu:**

Deney protokolünün sonunda sıçanlar derin anestezi (90mg/kg ketamin-10 mg/kg ksilazin karışımı, ip yol) altındayken, abdominal aortadan yaklaşık 7-8 ml kan alınarak eksanguinasyon yoluyla ötenazi edilmiştir. Daha sonra soleus kasları polipropilen tüpler içerisinde likit nitrojene daldırılarak dondurulmuş ve -80°C dondurucuda saklanmıştır. Her gün deney protokolünü tamamlayan 8 hayvan ötenazi edilmiştir.

### **3.3. Analiz Yöntemleri**

#### **3.3.1. Protein Karbonil Ölçümü İçin Doku Homojenatının Hazırlanması**

Soleus kasından 90mg alınarak 137mM sodyum klorür, 2,7mM Potasyum klorür, 10mM sodyum fosfat dibazik, 1,8mM potasyum fosfat monobazik, proteaz inhibitörleri içeren homojenizasyon tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 10.000xg'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiş ve ardından

süpernatantlar polietilen tüplere konarak analizler yapılncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### 3.3.2. Nükleik Asitlerin Uzaklaştırılması

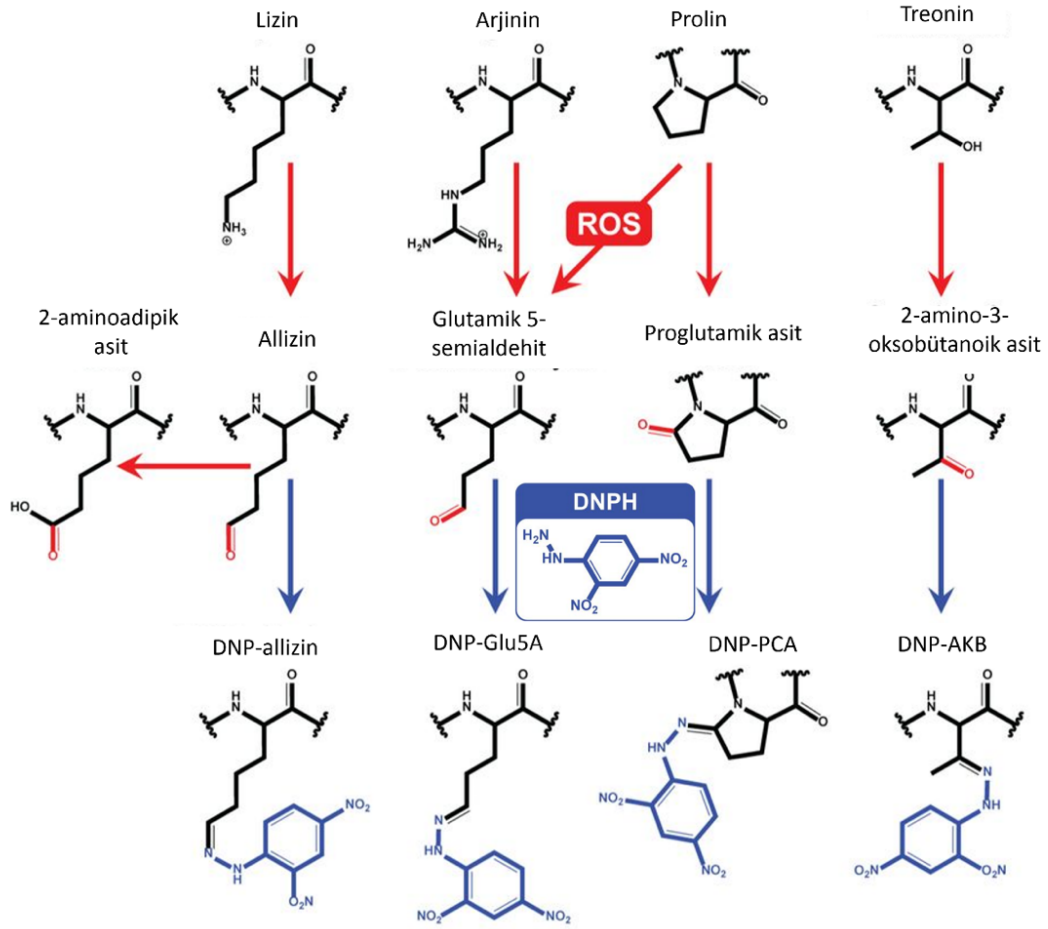
Nükleik asitler, yapılarında karbonil grubu içermeleri sebebiyle ortamdan uzaklaştırılmazlarsa DNPH ile reaksiyona girerek protein karbonil içeriğinin hatalı ölçülmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle santrifügasyon ile elde edilen süpernatantların 280 ve 260 nm'deki absorbanlarının ölçülmesi ve birbirlerine oranlanması önerilmektedir. Bu iki absorban değerinin oranının 1'den küçük olması nükleik asitlerle kontamine olabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmada örneklerin 280 ve 260 nm'deki absorbanları 0,96 olarak belirlenmiş ve nükleik asit uzaklaştırma işlemi aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- 1- Süpernatantlara 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH:7,2) hazırlanan %10'luk streptomisin sülfat, son konsantrasyonu %1 olacak şekilde eklenmiştir.
- 2- Süpernatantlar oda sıcaklığında streptomisin sülfat ile 15 dk inkübe edilmiştir.
- 3- İnkübasyon süresi tamamlandığında süpernatantlar 6000xg'de 10 dakika  $4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilmiştir.
- 4- Santrifüj sonrası süpernatantlar nükleik asitleri içeren çökeltiden dikkatli bir şekilde ayrılarak temiz polietilen tüplere aktarılmıştır.

### 3.3.3. Protein Karbonil Ölçümü

Bu çalışmada, oksitlenmiş proteinlerdeki karbonil gruplarının konsantrasyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)'in spektrofotometrik ölçümü kullanılmıştır. Bu yöntemin prensibi DNPH'nin protein karbonilleri ile reaksiyonuna dayanır (Şekil 3.2.). Bu reaksiyonda oluşan DNP hidrazonlar, 370 nm absorbansta spektrofotometrik olarak ölçülür (125).



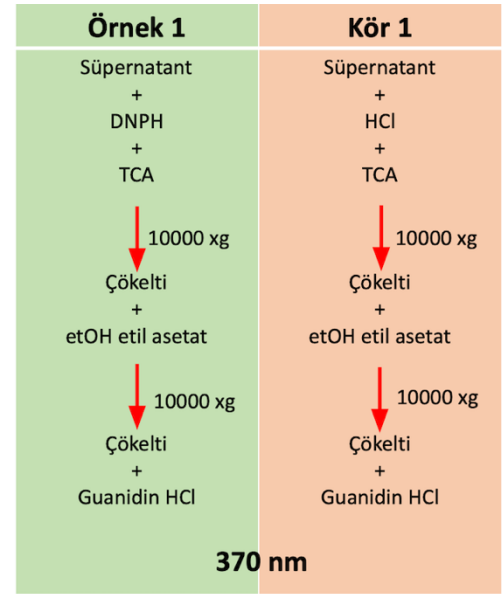


**Şekil 3.2.** Protein karbonil ölçümü çalışma prensibi.

Protein karbonil ölçümü için yaptığımız ön çalışmalarda örnekteki protein konsantrasyonunun 1,0-1,2 mg/ml aralığında olduğunda en tutarlı sonuçları elde ettiğimiz için sonuçları protein karbonil ölçümü öncesi, süpernatantların protein konsantrasyonu Bikinkoninik asit metodu (BCA) ile ölçülmüştür (BCA protein assay kit, TaKaRa, Katalog no: T9300A). Ölçüm sonrası süpernatantlar, son konsantrasyonu 1,0-1,2 mg/ml arasında olacak şekilde homojenizasyon tamponunda dilue edilmiştir.

Dilüsyon sonrası aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

1. Her bir örnekten 2 tüp olmak üzere 200ul örnek 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Tüplerden biri örnek diğeri kör tüpü olarak işaretlenmiştir.
2. Örnek tüplerine 800ul 2,5M HCl solüsyonunda hazırlanan DNPH çözeltisi, kör tüplerine ise 800ul 2,5M HCl eklenmiştir.
3. DNPH çözeltisi ışığa duyarlıdır. Bu nedenle hem örnek hem de kör tüpleri karanlık ortamdaki oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
4. Tüm tüplere 1ml %20'lik TCA solüsyonu eklenmiştir. Vorteks yapılmış ve tüpler 15 dk buzun üzerinde inkübe olmuştur.
5. DNPH çözeltisi ve TCA eklendikten sonra inkübe edilen örnek ve kör tüpleri 10000xg'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
6. Santrifügasyon sonrası süpernatantlar atılmış, çökelti 1 ml (1:1) ethanol/etil asetat karışımında vortekslenerek yıkanmış. Ardından 10000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Bu aşama 3 kez tekrar edilmiştir.
7. Son yıkamanın ardından çökelti 600ul guanidin hidroklorid solüsyonunda vorteks yapılarak çözdürülmüştür.
8. Guanidin hidroklorid solüsyonunda çözdürülen örneklerden 220ul, her örnek ve kör iki defa (duplicate) olacak şekilde mikropalakaya yüklenmiştir. Mikropalaka okuyucusunda her bir örnek ve o örneğin körünün 370 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülmüştür.
9. Protein karbonil ölçümünden geriye kalan örnek ve kör tüplerindeki protein içeriği kolorimetrik bir yöntem olan BCA yöntemi ile belirlenmiştir (BCA protein assay kit, TaKaRa, Katalog no: T9300A).



**Şekil 3.3.** Protein karbonil analizi için uygulanan prosedür.

### 3.3.4. Protein Karbonil Sonuçlarının Hesaplanması

1. Her örnek ve o örneğin köründen elde edilen absorbans değeri protein konsantrasyonuna oranlanarak normalize edilmiştir.
2. Örnek ve körün normalize edilen absorbans değerleri arasındaki fark alınarak düzeltilmiş absorbans (DA) değeri elde edilmiştir. Protein karbonil düzeyleri aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{Protein karbonil (nmol/mg protein)} = [(DA)/(0,0172\mu\text{M}^{-1*})]$$

\*DNPH için 370nm dalga boyunda ekstinksiyon katsayısı  $0,022 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  'dir. Bu değer 96 kuyuluk quartz mikrolaka kullanılarak, deney protokolünde belirtilen hacimde yüklenen solüsyonda ışığın kat ettiği yola göre düzenlenmiştir.

### 3.3.5. Western Blot Yöntemiyle 4-HNE Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Doku Homojenatlarının Hazırlanması

İzole edilen soleus kası makasla tamamen kıyma haline getirildikten sonra 30 mg alınarak 5mM Tris-HCl, 5 mM EDTA ve proteaz inhibitörleri içeren tampon (pH:7,4) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar  $1500 \text{ xg}$ 'de 10 dakika  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildikten sonra sitozolik proteinleri içeren süpernatantlar temiz polipropilen tüplere ayrılmıştır. Süpernatantlar 4-HNE analizleri yapılmaya kadar  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Sitozolik fraksiyonların protein konsantrasyonları kolorimetrik bir yöntem olan BCA yöntemi (BCA protein assay kit, TaKaRa, Katalog no: T9300A) ile belirlenmiştir (126).

### 3.3.6. Western Blot Analizi

Soleus kasında lipid peroksidasyonunun kantitatif olarak en önemli ürünlerinden biri olan 4-HNE düzeyleri Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir. Yaklaşık  $33\mu\text{g}$  protein, %12'lik jellere yüklenerek elektroforez sistemi (Bio-Rad, mini protean) ile 1,5-2 saat süreyle moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Ardından proteinler  $0,45\mu\text{m}$  kalınlığında nitroselüloz membranlara yarı kuru transfer sistemi

(Trans-Blot Turbo, BioRad) ile 25V akımda 30 dakika süresince transfer edilmiştir. Transfer işlemi tamamlanan membranlar, TTBS (%1 Tween 20 içeren tris-salin tamponu) ile yıkandıktan sonra içerisinde %5 kuru süt içeren TTBS ile 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklama işleminden sonra tekrar TTBS ile yıkanan membranlar anti-4 Hydroxynonenal birincil antikorla (Abcam, ab46545) üretici firmanın önerileri doğrultusunda +4°C'de bütün gece inkübe edilmiştir. Birincil antikorlar ile inkübasyon tamamlandıktan sonra TTBS ile yıkanan membranlar horse radish peroxidase (HRP)'a konjuge ikincil antikor 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) kullanılarak görüntülenmiştir. Protein bantlarının dansiteleri ImageJ programı, NIH görüntü analizi (127) ile yapıldıktan sonra membranlar örneklerdeki total protein miktarının belirlenmesi için Ponceau S ile boyanmıştır (%5 glasiyal asetik asit içerisinde %0,1 Ponceau S). Protein bantlarından elde edilen dansiteler total proteinden elde edilen dansitelerle normalize edilmiştir.

### **3.3.7. AOPP Analizi İçin Doku Homojenatlarının Hazırlanması**

İzole edilen soleus kası makasla tamamen kıyma haline getirildikten sonra 30 mg alınarak 5mM Tris-HCl, 5 mM EDTA ve proteaz inhibitörleri içeren tampon (pH:7,4) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 1500 xg'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildikten sonra sitozolik proteinleri içeren süpernatantlar temiz polipropilen tüplere ayrılmıştır. Süpernatantlar AOPP analizi yapıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Sitozolik fraksiyonların protein konsantrasyonları kolorimetrik bir yöntem olan BCA yöntemi (BCA protein assay kit, TaKaRa, Katalog no: T9300A) ile belirlenmiştir (126).

### **3.3.8. AOPP Analizi**

AOPP analizi, Witko-Sarsat ve diğerlerinin yöntemine göre belirlenmiştir (40). AOPP analizi için elde edilen süpernatantlar 1:8 (v/v) oranında PBS ile dilue edilmiştir. 0-100 uM arasındaki konsantrasyonlarda PBS'te hazırlanan Kloramin T

standartları kullanılmıştır. 200ul kloramin T standardı ve 200ul dilusyonlu örnekler mikropalakaya yüklenmiştir. Her bir kuyuya 10ul 1,16 M Potasyum İyodür (KI) eklenmiş ve iki dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben 20ul %100 asetik asit eklenerek reaksiyon sonlandırılmış ve 340 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür.

Örneklerin konsantrasyonu, Kloramin T standartlarından elde edilen lineer denklem kullanılarak hesaplanmış ve kloramin T eşdeğerliği olarak ifade edilmiştir. Örneklerdeki proteinin ne kadarının oksidatif hasara maruz kaldığının belirlenmesi için örneklerin protein içeriğinin analiz edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle kolorimetrik bir yöntem olan BCA yöntemi ile örneklerdeki protein konsantrasyonu belirlenmiştir (BCA protein assay kit, TaKaRa, Katalog no: T9300A). AOPP analizi sonucu elde edilen değerler örneklerdeki protein konsantrasyonuna normalize edilerek Kloramin T eşdeğerliği/mg protein şeklinde ifade edilmiştir.

### **3.3.9. Verilerin Analizi**

Değişkenler ortalama, standart sapma ve yüzde değişim olarak ifade edilmiştir. K ve İ grupları arasındaki karşılaştırmalar için bağımsız gruplarda t-testi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde  $p < 0.05$  düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 23.0 programı kullanılmıştır (IBM Corp., Amonk, NY, ABD)

#### 4. BULGULAR

Bu çalışma, inaktivite ya da yatak istirahati gibi iskelet kasına giden nöral uyarıların ya da kasa etki eden yükün azalmasına neden olan koşulları taklit eden bir immobilizasyon modeli olan yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeli uygulamasının iskelet kasında oksidatif stres düzeyine etkisinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu doğrultuda, yedi gün süresince uygulanan yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modelinin soleus kasında lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. On altı Wistar Albino 3-4 aylık erkek sıçan, kontrol (K, n=8) ve immobilizasyon (İ, n=8) olmak üzere iki gruba rasgele atanmıştır. K grubundaki hayvanlar yedi gün standart hayvan kafeslerinde barındırılmış, İ grubundaki hayvanlar ise yedi gün boyunca yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modelilerde barındırılarak immobilize edilmiştir.

K ve İ gruplarında yer alan hayvanlardan izole edilen soleus kaslarında oksidatif stres hasarı belirteçleri olan protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu düzeyleri değerlendirilmiştir. Protein oksidasyonu, protein karbonil ve AOPP düzeyi spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonu göstergesi olan 4-HNE protein düzeyleri ise Western Blot yöntemi ile incelenmiştir.

##### 4.1. Vücut ve Kas Ağırlıkları Bulguları

Tablo 4.1'de grupların deney protokolüne dahil oldukları gün ve ölmeden önceki vücut ağırlıkları değişimi sunulmuştur.

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

Gruplar	Başlangıç VA (gr)		8. gün VA (gr)	
	$\bar{x} \pm Ss$	p=0,447	$\bar{x} \pm Ss$	p=0,063
K	344,0±16,5		370,0±15,0	
İ	337,4±14,8		353,4±15,7	

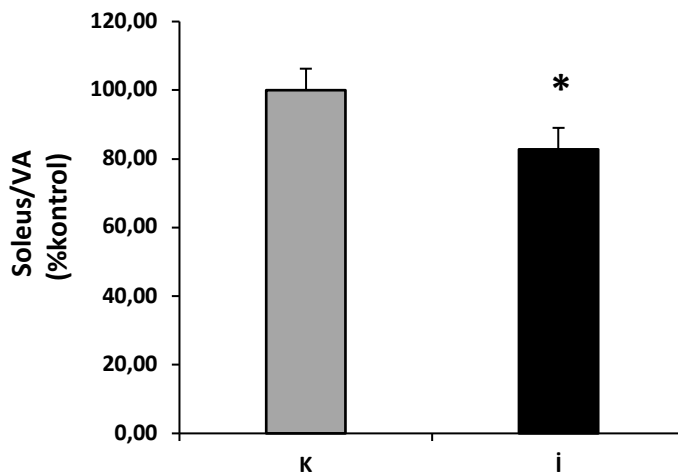
Tablo 4.1.'de deney hayvanlarının vücut ağırlıkları ortalama ve standart sapma değerleri sunulmuştur. Deney protokolü sonunda immobilizasyon uygulamasına tabi tutulan hayvanların son ölçülen vücut ağırlıklarının K grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmektedir ( $p=0,063$ ).

Tablo 4.2'de her iki grupta yer alan hayvanların soleus kas ağırlıklarının 8. güne ait son ölçülen vücut ağırlıklarına oranı verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Soleus kas ağırlıklarının son ölçülen vücut ağırlıklarına oranları.

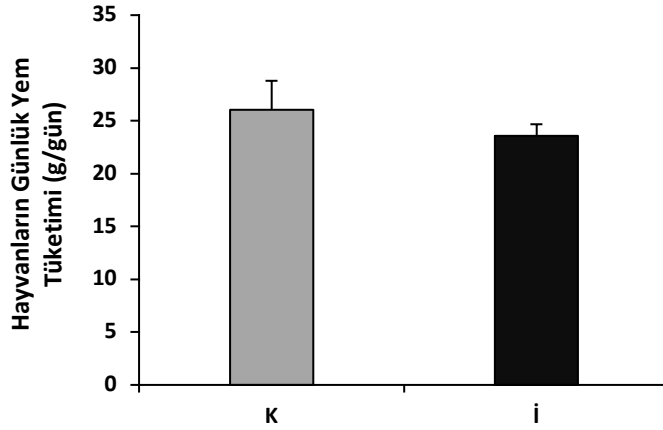
Gruplar	Soleus/VA (mg/g)	
	$\bar{x} \pm Ss$	$p=0,000$
K	39,5±2,5	
i	32,7±1,7	

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi 7 gün yaşam alanı sınırlandırılmış kafeslerde tutulan sıçanların soleus kas ağırlıklarının son ölçülen vücut ağırlığına oranı kontrol grubuna göre %17.2 daha düşüktür ( $p=0,000$ ).

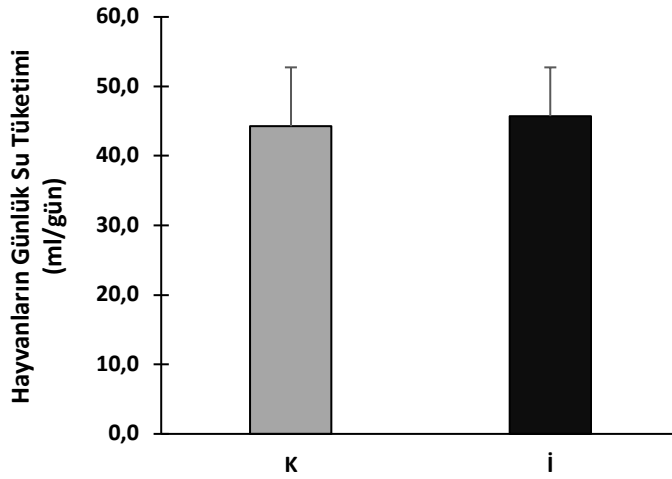


**Şekil 4.1.** Immobilizasyonun soleus/VA'ya etkisi.

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3, immobilizasyonun hayvanların yem ve su tüketimlerine etkisini göstermektedir. Buna göre, deney protokolleri süresince İ ve K grubundaki hayvanların yem ( $p=0,055$ ) ve su ( $p=0,734$ ) tüketimleri istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.2. Immobilizasyonun hayvanların günlük yem tüketimine etkisi.



Şekil 4.3. Immobilizasyonun hayvanların günlük su tüketimine etkisi.



## 4.2. Protein Karbonil Ölçümü Bulguları

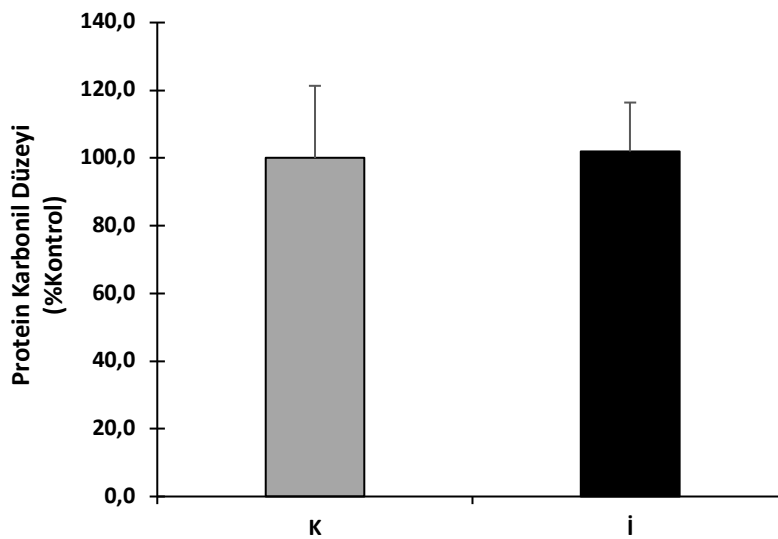
Tablo 4.3.'te soleus kasında protein karbonil düzeylerine ilişkin bulgular sunulmuştur.

**Tablo 4.3.** Soleus kasında protein karbonil düzeyleri.

Gruplar	Protein karbonil düzeyleri (nmol/mg protein)	
	$\bar{X} \pm Ss$	p=0,846
K	19,57±4,2	
İ	19,94±2,8	

Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi 7 gün süreyle yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeli yoluyla uygulanan immobilizasyon, soleus protein karbonil düzeylerinde bir değişikliğe yol açmamıştır (p=0,846).

Protein karbonil ölçümünden elde edilen bulguların İ ve K grubu arasındaki %değişim, Şekil 4.4'teki grafikte sunulmuştur.



**Şekil 4.4.** Immobilizasyonun soleus kası protein karbonil düzeyleri üzerine etkisi.

### 4.3. AOPP Bulguları

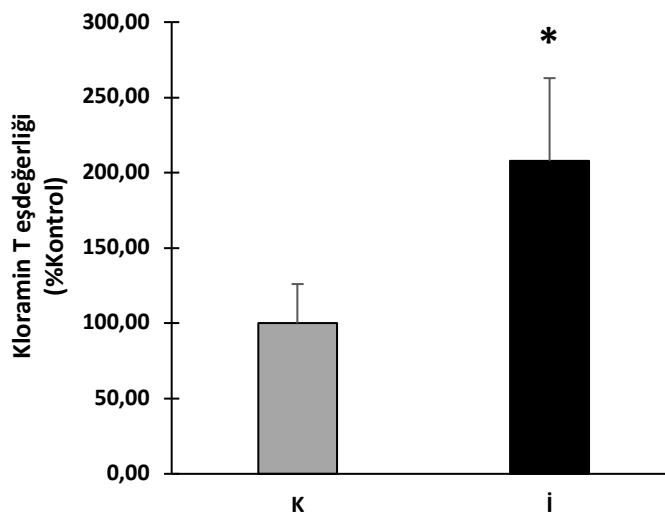
Tablo 4.4'te AOPP ölçümüne ilişkin elde edilen bulgular sunulmuştur.

**Tablo 4.4.** Soleus kasında AOPP düzeyi.

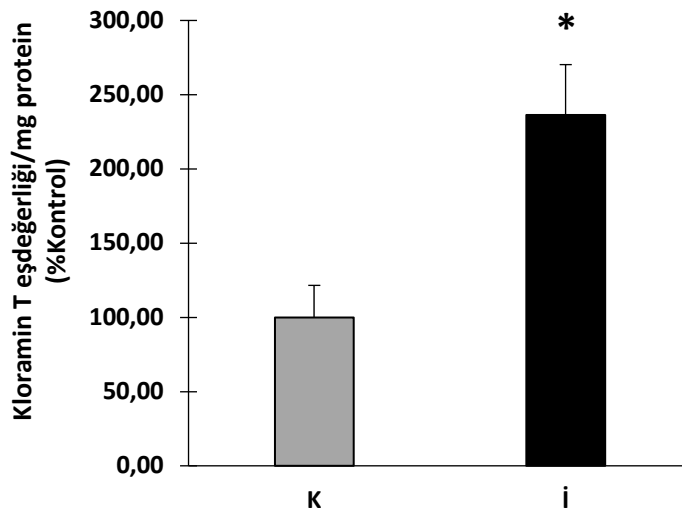
Gruplar	Kloramin T eşdeğerliği		Kloramin T eşdeğerliği/mg protein	
	$\bar{X} \pm Ss$	p=0,001	$\bar{X} \pm Ss$	p=0,000
K	99,1±25,80		25,2±5,42	
i	206,0±54,44		45,46±8,54	

Tablo 4.4'te soleus kasında AOPP düzeylerinin kloramin T eşdeğerliği (p=0,001) ve kloramin T eşdeğerliğinin (0,000) örneklerdeki protein konsantrasyonuna oranı K grubu ile karşılaştırıldığında i anlamlı olarak artmıştır.

Tablo 4.4'te sunulan soleus kasında AOPP düzeylerinin kloramin T eşdeğerliği ve kloramin T eşdeğerliğinin örneklerdeki protein konsantrasyonuna oranına ilişkin bulguların K grubuna göre %değişim Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'teki grafikler ile sunulmuştur.



**Şekil 4.5.** Soleus kasında AOPP'nin kloramin T eşdeğerliği.



**Şekil 4.6.** Soleus kasında AOPP'nin kloramin T eşdeğerliğinin örneklerdeki protein konsantrasyonuna oranı.

#### 4.4. Protein Analizi Bulguları

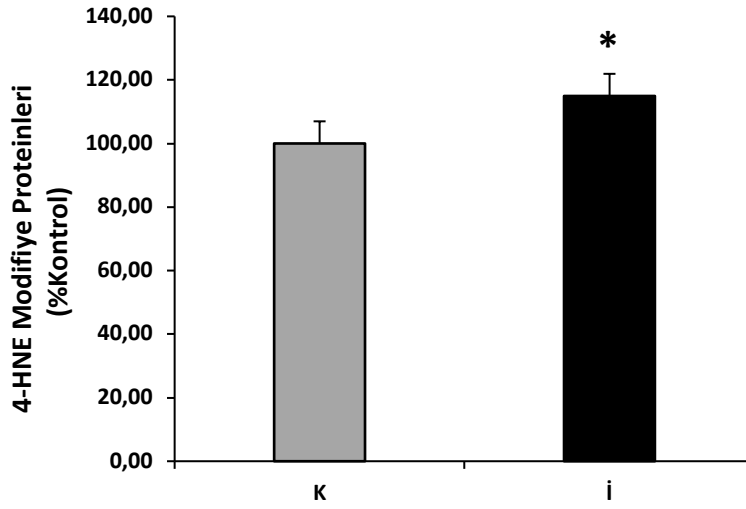
Tablo 4.5'te soleus kasında Western Blot yöntemiyle analiz edilen 4-HNE protein düzeylerinin K grubuna göre yüzdeleri sunulmuştur.

**Tablo 4.5.** Soleus kasında 4-HNE optik yoğunluk yüzdeleri.

Gruplar	Optik Yoğunluk (% Kontrol)	
	$\bar{X} \pm Ss$	$p=0,013$
K	100,0 $\pm$ 7,0	
i	114,0 $\pm$ 13,0	

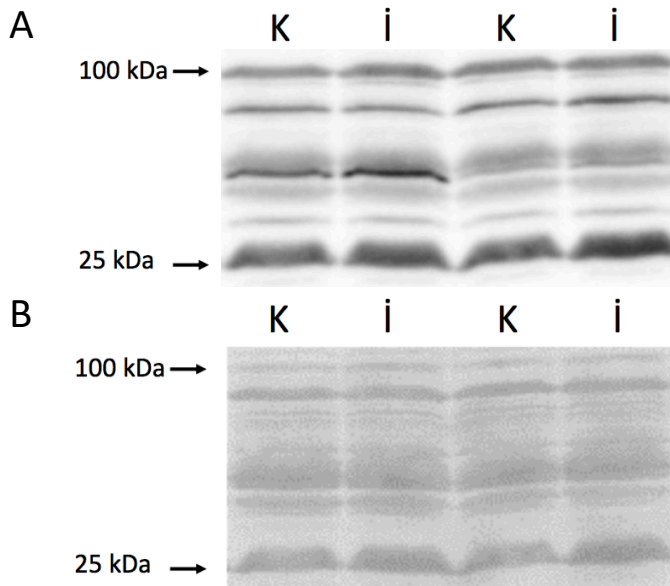
Tablo 4.5'te görüldüğü gibi 4-HNE protein düzeyleri i grubunda, K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır ( $p=0,013$ ).

İmmobilizasyonun soleus kasında 4-HNE düzeyleri üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.7'da sunulmuştur.



**Şekil 4.7.** Soleus kasında 4-HNE modifiye proteinleri düzeyi.

Şekil 4.8'de 7 günlük immobilizasyonun soleus kasında çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan 4-HNE protein düzeylerine etkisinin Western Blot yöntemiyle belirlendiği temsili membran ve total protein boyamasına ilişkin membran görüntüsü sunulmuştur.



**Şekil 4.8.** Western Blot görüntüleri.

A. Temsili membran görüntüsünde K ve İ gruplarına ait örneklerde, 25 ve 100 kDa arasında ayrışan proteinlerdeki 4-HNE düzeyleri. B. Ponceau S boyaması ile elde edilen total protein membran görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA

İskelet kasları insan vücut ağırlığının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Genel olarak iskelet kaslarının temel görevi kuvvet üretmek ve hareketi sağlamak olarak bilinse de, organizmada glisemik kontrol, metabolik genlerin regülasyonu, metabolik homeostazın korunmasında önemli bir rol üstlenir. Bununla birlikte, salgıladığı miyokinler yoluyla diğer organlarla gerçekleştirdiği karşılıklı iletişim nedeniyle önemi daha da artan iskelet kasları son yıllarda bir endokrin organ olarak kabul görmüştür (1). Sağlıklı bir iskelet kas kütlelerinin varlığı obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çok sayıda kronik hastalıktan korunmada ve hayat kalitesinin sürdürülebilmesinde kritik bir öneme sahiptir (2).

İmmobilizasyon ya da daha geniş anlamda kullanmama gibi kontraktıl aktivitenin azaldığı ya da ortadan kalktığı durumların kas hücresinde protein yapım ve yıkımı arasındaki dengeyi olumsuz yönde etkileyerek iskelet kaslarında yapısal ve fonksiyonel bir bozulmaya yol açtığı bilinmektedir. Bu durum, iskelet kasında somut olarak kütleli küçülme, kas kuvveti ve dayanıklılığında azalma ile karakterize iskelet kası atrofisi ile sonuçlanır (3, 128, 129). Böylece ortaya çıkan kas kayıpları, kemik kırıkları ya da benzeri ciddi yaralanmalar sonrası tek bir ekstremitenin belirli bir süre immobilizasyonu nedeniyle belirli bir kas grubunu etkilerken (130), uzun süreli yatak istirahatine bağlı olarak vücuttaki çoğu iskelet kasında meydana gelmektedir (131).

İskelet kasında kullanmamaya bağlı meydana gelen atrofi sürecinde, kas proteinlerinde görülen asıl kayıplar kas hücresinin %60'ını oluşturan ve kontraksiyondan sorumlu olan miyofibriler proteinlerde meydana gelir. Bütün bu değişimler, kas kuvveti ve dayanıklılığında gerileme ya da birçok kronik hastalığın gelişimini de beraberinde getirerek yaşam kalitesinde azalma ile sonuçlanır (132-135).

Normal koşullarda iskelet kaslarında serbest radikallerin üretimi hücrenin antioksidan kapasitesini aştığında oksidatif stres meydana gelir. Lipid, protein ve

nükleik asitlerin yapı ve fonksiyonunda değişikliğe yol açan oksidatif stres hücre hasarına ve hatta ölümüne neden olabilir (136).

İskelet kasının kontraksiyonu sırasında serbest radikal üretiminin arttığına ilişkin ilk çalışma Davies ve diğerlerinin egzersizin iskelet kasında serbest radikallerin artışını ortaya koyduğu çalışmadır (137). Bu çalışmada, tükenene kadar yapılan egzersiz mitokondri solunum kapasitesinde azalmanın yanı sıra, sarkoplazmik retikulum bütünlüğünde bozulma ve lipid peroksidasyonunda artışa neden olmuştur (137). Benzer şekilde kontrakte kasta oluşan serbest radikallerin iskelet kasında yorgunluğa neden olduğu (138, 139) ve aynı zamanda hem yetişkin hem de yaşlı farelerde mitokondri kaynaklı serbest radikal üretiminde artışa yol açtığı bildirilmiştir (140).

İlginç olarak iskelet kası aktivitesindeki artışın tam aksine, inaktivite veya kullanılmamanın da serbest radikal üretiminde artışa yol açtığı ileri sürülmüştür (139, 141, 142). Kullanılmamaya bağlı olarak ortaya çıkan iskelet kası atrofisinde oksidan stresin rol oynayıp oynamadığına ilişkin çalışmalarda uygulanan kullanmama atrofisi modeli ve bu modelin hangi hayvan türünde gerçekleştirdiğine bağlı olarak farklı sonuçların elde edilmiş olması bu konuda neden sonuç ilişkisinin tam olarak ortaya konmasını zorlaştırmaktadır (143). Bu zorlukta, serbest radikallerin aynı zamanda önemli bir sinyal molekülü olması da rol oynamaktadır. Örneğin, şiddetli egzersizlerde artan serbest radikal üretimi lipid peroksidasyonuna, proteinlerin karbonilasyonuna ve genel olarak kas hasarına yol açarken (144, 145), orta şiddetteki egzersizlerde serbest radikal üretimi mitokondri biyogenezi ve antioksidan savunmanın geliştirilmesi gibi pozitif sonuçlar doğurmaktadır (146, 147). Nitekim, antioksidan uygulaması bir yandan yoğun egzersizlerde oluşan hasarı azaltırken, bir yandan da egzersize olan adaptasyonu ortadan kaldırmaktadır (146, 147).

Bununla birlikte inaktif kaslarda da serbest radikal üretimi ve oksidatif hasarın arttığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmakta olup (9, 104, 105, 148-150), kullanmama koşullarında iskelet kasında artan oksidatif stresin, protein sentezi

ve degradasyonu arasındaki dengenin bozulmasına bağlı gelişen atrofinin altında yatan temel mekanizma olduğu ileri sürülmüştür (104, 151). İmmobilizasyon veya iskelet kasına etki eden yükün azaldığı kuyruktan asma yoluyla yüksüzleştirme modelinde serbest radikal artışı ve antioksidan savunmada bir azalma söz konusudur (9, 105). Oksidatif strese bağlı iskelet kası atrofisinin altında yatan mekanizmalar içerisinde artan kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) ile birlikte kalpain sistem, nükleer faktör  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) yolağı ve mitojenle aktive olan protein sinyal yolağının rol oynadığı görülmektedir (148). Bununla birlikte, hücrede  $H_2O_2$  artışının TNF- $\alpha$  üzerinden NF $\kappa$ B yolağını aktive ettiği bilinmektedir (152).

Sıçanda kullanmamaya bağlı iskelet kasında serbest radikal artışında ksantin oksidaz ve NOX katkısı olduğu görülmektedir (57, 61). Öyle ki, sıçanlarda mekanik ventilasyon uygulaması sırasında NOX inhibitörü verilmesinin kalpainin endojen inhibitörü olan kalpastatin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (57). Benzer şekilde, ksantin oksidaz inhibitörü oksipurinol kısmen de olsa mekanik ventilasyonun yol açtığı protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu azaltmıştır (61).

Kullanmama koşullarının bir sonucu olan iskelet kasında meydana gelen kayıplarda radikallerin oynadığı rolü ortaya koyan çalışmalar, genellikle dolaylı olarak serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun değerlendirilmesine ve/veya antioksidan savunma sisteminin gerilemesine ya da antioksidan destek ürünlerinin oksidatif stresin oluşturduğu etkiyi azalttığına gösterilmesine dayanmaktadır. Bu tez çalışmasında enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi ürünleri değerlendirilmemiş olmakla birlikte, kullanmamaya bağlı iskelet kasında lipid peroksidasyonu belirteci olarak 4-HNE, protein oksidasyon ürünleri olarak da AOPP ve protein karbonil düzeyleri incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, kullanmamaya bağlı olarak iskelet kasında protein karbonil düzeylerinde bir artış bulunmamış, ancak AOPP ve 4-HNE düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da doğrudan sebep sonuç ilişkisini işaret etmemekle birlikte, yedi gün süreli yaşam alanı sınırlandırılması ile oluşturulan

kullanmama modelinin iskelet kasında atrofi ve oksidatif streste anlamlı artışa yol açması, literatürde yer alan ve kullanmama atrofisinde oksidan stresin rol oynadığını düşündüren çalışmaları desteklemektedir.

Kullanmamanın iskelet kasında oksidatif stres üzerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışmalarda, ayak bileği ekstansiyon pozisyondayken uygulanan immobilizasyonunun  $H_2O_2$  düzeylerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (9, 105). Oksidatif stres artışının bir belirteci olarak, salisilik asit verilen sıçanlarda on iki gün immobilizasyonda kalan bacağın soleus kasında hidroksil radikalının salisilat ile reaksiyonunun göstergesi olan 2,3-dihidroksibenzoik asit düzeylerinde artış görülmüştür (10). İnaktivite bir yandan antioksidan kapasitede azalmaya yol açarken, diğer yandan inaktif kas liflerinde radikal üretimine neden olur (65, 153). Arka bacak askısı yoluyla uygulanan immobilizasyon modelinde 14 gün sonunda hayvan soleus kasında  $H_2O_2$  salınımının kontrol grubuna göre %100 artış gösterdiği ve mitokondrinin ROS'un üretildiği ana organel olduğu ifade edilmiştir (58, 59). Ayrıca, uzun süreli inaktivite, daha düşük düzeyde de olsa sitozolik ROS üretimine de neden olmaktadır (154).

Karbonil oluşumu protein oksidasyonunda gözlenen en yaygın hasar çeşitidir. Çeşitli hayvan modellerinde kullanmamaya bağlı iskelet kasında protein karbonil düzeylerinde artış gösterilmiştir. Sıçanda on dört günlük arka bacak askısı soleus kas ağırlığında %44 azalma ve protein karbonil düzeylerinde de %44 artışa yol açarken, antioksidan  $\alpha$ -tokoferol takviyesinin kas antioksidan aktivitesini artırdığı halde protein karbonil düzeylerindeki artışı önleyemediği görülmüştür (110). Aynı çalışmada soleus ve gasroknemius kas ağırlıklarının %44,5 ve %29,2 azaldığı ve antioksidan takviyenin bu atrofi üzerinde etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada gastroknemius kasında bir lipid peroksidasyonu belirteci olan MD düzeyleri de değerlendirilmiş ve on dört günlük arka bacak askısının MDA düzeylerinde bir değişime yol açmadığı görülmüştür (110).

On iki saatlik mekanik ventilasyon sonrası diyafram kasında serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan kapasite ve GSH düzeylerinin azaldığı ve bu durumun



artmış oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (153). Benzer şekilde on sekiz saatlik mekanik ventilasyonun diyafram kasında protein karbonil seviyelerinin ölçümüne dayanan protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu artırdığı görülmüştür (121, 155). Araştırmacılar bu çalışmada mekanik ventilasyona maruz kalan sıçanlara bir antioksidan olan trolox uyguladıklarında diyafram kasında görülen kalpain ve kaspaz-3 aktivasyonunun azaldığını ve kas lifi atrofisinin önlendiğini gözledikleri için, bu modelde oluşan atrofi ve kontraktıl fonksiyondaki azalmada temel nedenin oksidatif stres olduğunu ileri sürmüşlerdir (154).

İnsanda kullanmama modellerinden biri olan uzun süreli yatak istirahatinin sekizinci ve otuz beşinci gününde alınan kas biyopsi örneklerinde protein karbonil düzeyleri oxyblot analiziyle araştırılmıştır. Buna göre sekizinci gün yatak istirahati kas lif enine kesit alanında bir azalmaya veya protein karbonil düzeylerinde bir değişikliğe yol açmazken, otuz beşinci günün sonunda vastus lateralis kasından alınan biyopsi örneklerinde kas lifleri enine kesit alanında %18 oranında bir azalma ve oksidatif stresin bir göstergesi olan protein karbonil düzeylerinde de artış görülmüştür (156). Bu tez çalışmasında da söz konusu insan çalışmasına benzer bir kullanmama modeli uygulanmıştır. Bununla birlikte, yedi gün süreli yaşam alanı sınırlandırılmış kafes uygulaması sıçan soleus kas ağırlığı/vücut ağırlığı oranında %17,2 kayba yol açarken, protein karbonil düzeylerinde bir artış saptanmamıştır. Diğer yandan, bu çalışmada bir diğer protein oksidasyonu belirteci olan AOPP düzeylerinin yedi günlük kullanmama süreci sonunda artış gösterdiği saptanmıştır. Bütün bu bulgular, yedi günlük yaşam alanı sınırlandırılmış kafes uygulamasıyla oluşan kullanmama koşullarında protein oksidasyonunun görüldüğüne işaret etmektedir. Diğer yandan bu tez çalışmasındaki protein oksidasyonuna ilişkin bulgular, sıçan soleus kasında protein karbonil artışının on dört günlük arka bacak yüksüzleştirmesi sonrasında görülmesi (110) ve insanlarda sekiz değil ama otuz beş günlük yatak istirahatinin protein karbonil düzeylerinde artışa neden olması (156) ile birlikte değerlendirildiğinde, AOPP'nin protein karbonil ölçümünden daha hassas sonuç verebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada protein oksidasyonunu değerlendirmek için kullandığımız AOPP yöntemi ilk kez Witko-Sarkat ve diğerleri tarafından önce üremik sonra böbrek yetmezliği olan hastaların plazmasında protein hasarının bir göstergesi olan yeni bir oksidatif stres belirteci olarak ortaya konmuştur (40, 157-159). Sonraki yıllarda diyabetes mellitus (160, 161), romatoid artrit (162) ve koroner arter hastalıklarında (163) AOPP'nin artış gösterdiği ve tavşan modelinde AOPP birikimi ile ateroskleroz arasında ilişki olduğu (164) gösterilmiştir. Herhangi bir kardiyak olay yaşamamış erkeklerde ortalama ve maksimal karotis intima media kalınlığı ile AOPP arasında pozitif bir ilişki olduğu ve aterosklerotik değişiklikler için AOPP'nin bir belirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (165). Diğer yandan bugüne kadar AOPP düzeylerinin immobilizasyona bağlı olarak nasıl değiştiğine ilişkin literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında lipid peroksidasyonunu belirlemek için soleus kasından alınan örneklerde Western Blot yöntemi ile 4-HNE düzeyleri değerlendirilmiştir. Artmış serbest radikaller lipid peroksidasyona yol açar. Dolayısıyla oksidatif stres sonucunda artış gösteren serbest radikaller ikincil araçlar olan 4-HNE ve MDA düzeylerinde artışa neden olur (166). Böylece, 4-HNE lipid peroksidasyon yan ürünü olarak oksidatif stresin bir biyobelirteci olup, en ciddi reaktif aldehytlerden biri olarak bilinir (166). 4-HNE özellikle bir kısmı redoks sinyalinde görev alan tiyol içeren proteinlerin sistein bölgesiyle reaksiyona girerek eklentiler oluşturur (167). 4-HNE artışının kanser (168), Alzheimer (169, 170) ve Parkinson (171) gibi hastalıklarda arttığı bildirilmiştir. 4-HNE mitokondriyi etkileyerek ATP üretim kapasitesini düşürmektedir (172). Dolayısıyla çalışmamızda yaşam alanı sınırlandırılmış kafes yoluyla yedi gün süresince inaktif koşullarda yaşayan sıçanların soleus kasında 4-HNE düzeylerinde artış görülmesi, özellikle mitokondrial ATP üretim kapasitesinin azaldığını düşündürmektedir.

Daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir çalışmada on dört günlük bilateral alçı yoluyla gerçekleştirilen immobilizasyonun soleus kasında AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) düzeylerini önemli ölçüde azalttığı ve p-AMPK/AMPK

oranını düşürdüğü görülmüştü (173). AMPK, oksidatif metabolizmanın bir sonucu olarak açığa çıkan serbest radikallere karşı antioksidan yanıtın gelişmesinde de kritik bir öneme sahiptir. Rabinovitch ve diğerleri AMPK geninden yoksun embriyonik fare fibroblastlarında bazal mitokondriyal serbest radikal düzeylerinin yaklaşık %50 oranında arttığını göstermiştir (174). Bütün bu bulgular, immobilizasyon sürecinde hücrede bir enerji sensörü olarak görev yapmakta olan AMPK aktivasyonundaki azalmanın iskelet kası atrofisine yol açan mitokondriyal ROS üretimine katkıda bulunacağını göstermektedir. Bu modelde iskelet kasında AMPK fosforilasyonunun nasıl etkilendiği merak konusudur.

İmmobilizasyon, mitokondri membran bütünlüğünü bozmakta, lipid peroksidasyonunu artırmakta (175), serbest radikal üretimi ve mitokondriyal oksidatif stresin bir göstergesi olarak 8-oh-dG ve bu çalışmada da gördüğümüz gibi 4-HNE birikiminde artışa yol açmaktadır (176). Mitokondri, kas hücrelerinin  $Ca^{+2}$  deposu olan sarkoplazmik retikulumla birlikte kalsiyum homeostazının sağlanmasında görev alır. Uzayan immobilizasyon koşullarında sarkoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  salınımı  $Ca^{+2}$ 'un sitozolik düzeyleri ve dolayısıyla mitokondriyal  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artışına neden olur (66). Bu durum Krebs çemberinin aktivasyonunda ve dolayısıyla ETZ yükünde artışa yol açarak daha fazla ROS üretimi ile sonuçlanır (67, 177). ETZ'de elektronların transferinde görev alan sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması da, ETZ'den normal koşullardan daha fazla elektron kaçağının meydana gelmesine katkıda bulunur (178). Tüm bunların ortak sonucu olarak iskelet kaslarında serbest radikal üretimi artar. Gerçekten de, alçılama, denervasyon, mekanik ventilasyon gibi modellerin kullanıldığı çok sayıda çalışma iskelet kaslarında ROS üretiminin mitokondride arttığını göstermiştir (58, 65, 179, 180). İki hafta süresince alçılama yoluyla immobilize edilen sıçanların plantaris ve soleus kaslarında mitokondriden salınan  $H_2O_2$  düzeyleri %100 artmış (58), mitokondriyi hedef alan bir antioksidan olan SS-31 ise soleus, plantaris ve diyafram kaslarında immobilizasyonla artan serbest radikal düzeylerinin azalmasına neden olmuştur (58, 59).

Suda eriyen bir flavonoid olan kuersetinin sirtuin-FoxO, NFκB ve Nrf-2/ARE yollarını modifiye ettiği gösterilmiştir (181). Kuersetine maruz bırakılan ARPE-19 hücrelerinde 4-HNE aracılı hasara karşı direnç oluştuğunun gösterilmesi (181), uyguladığımız immobilizasyon modelinde iskelet kasında görülen artmış 4-HNE düzeylerinin sirtuin-FoxO ve NFκB yolağını olumsuz etkileyerek atrofi ile ilgili genlerin aktivasyonuna neden olabileceği ve aynı zamanda antioksidan genlerin aktivasyonundan sorumlu Nrf-2/ARE yolağını da olumsuz etkileyerek antioksidan savunmayı zayıflatacağını ve soleus kasında immobilizasyona bağlı gelişen kas atrofisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Uzun süreli immobilizasyonun serbest radikallerin alt akımında yer alan NFκB sinyal yolağını aktive ederek TNF-α, IL-1β, IL-6 gibi proinflamatuvar miyokin ve sitokinlerin düzeylerinde artışa neden olduğu bilinmektedir (175, 182). Artan TNF-α ve IL-1β da, mitokondri ETZ, NOX ve lipoksigenaz üzerinden serbest radikal üretimine neden olmakta ve oksidatif stresi artırmaktadır. Antioksidan takviyesinin NFκB aktivitesini ve kas atrofisini baskıladığı (183-185), sıçanlarda soleus kasında plazmid yoluyla katalaz ekspresyonunun artırılmasının da yedi günlük kuyruktan asma modeli ile oluşan kas atrofisini önlediği gösterilmiştir (186). Bu çalışmada NFκB sinyal yolağı değerlendirilmemiş olup, yaşam alanı sınırlandırılmış kafes yoluyla oluşturulan immobilizasyon modelinde görülen atrofide NFκB sinyal yolağının ne ölçüde rol oynadığının aydınlatılması immobilizasyon yoluyla oluşan iskelet kas atrofisinde oksidatif stres ve NFκB sinyal yolağı arasındaki ilişki açısından önemli olabilir.

Yukarıdan verilen literatür bulguları, gerçekleştirilen bu tez çalışmasıyla birlikte değerlendirildiğinde, iskelet kasında immobilizasyonla artan 4-HNE düzeylerinin genel olarak mitokondri ATP üretiminde bir azalmaya neden olduğu ve protein sentezi gibi ATP'nin son derece önemli olduğu bir sürecin ATP üretiminin azalması durumunda baskılanmasının doğal olarak hücresel küçülme ve atrofiyi beraberinde getirmesi beklenir. Diğer yandan, insanda dizin 60 derece fleksiyonda tutulmasıyla ayağın yere temasının önlediği immobilizasyon modelinde on

dördüncü gün kuadriseps kas kesit alanında %5,9'luk bir azalma görülürken, iki ve on dördüncü gün vastus lateralis kasından alınan biyopsi örneklerinde protein karbonil ve 4-HNE düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (187). Bu çalışmada sıçanların yedi gün yaşam alanı sınırlandırılmış kafeste barındırılması soleus kasında protein karbonil düzeylerinde bir değişikliğe yol açmazken 4-HNE düzeylerinde artışa neden olmuştur.

İskelet kasları enerjinin yoğun olarak üretildiği ve dolayısıyla da serbest radikal hasarına en çok maruz kalan doku/organlardan biridir. İskelet kaslarının metabolik gen regülasyonu ve metabolik homeostazın sağlanmasındaki kritik rolü ve bir endokrin organ olarak salgıladığı miyokinlerle diğer organ ve dokularla çapraz iletişimde olduğu göz önüne alındığında (188), iskelet kaslarında kullanmamaya bağlı meydana gelen kayıpların insülin direnci, tip 2 diyabet, metabolik sendrom gibi birçok hastalık ve patolojik durumun oluşumunu da beraberinde getirmesi kaçınılmazdır (189, 190). 4-HNE'nin birçok hastalık için kritik düzeyde bir patolojik hedef olduğu bilinmektedir (191). 4-HNE'nin proteinler üzerindeki kovalent modifikasyonunun önlenmesi veya 4-HNE'yi modifiye edecek yeni maddelerin oksidatif stres kaynaklı patolojilerin önlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir (191). Bu çerçevede immobilizasyonun neden olduğu 4-HNE artışının önlenmesi kullanmamaya bağlı ortaya çıkan iskelet kas atrofisinin önlenmesinde de önemli bir yaklaşım olabilir.

Bu tez projesinde uygulanan atrofi modeli deney hayvanlarının yaşam alanı sınırlandırılmış kafeste barındırılmalarına bağlı olarak aktivitelerinin oldukça sınırlandırıldığı bir model olup, uzun süreli yatak istirahatine benzer bir kullanmama modelidir. Bu modelde yedi günlük kullanmama soleus kas ağırlığının vücut ağırlığına oranında %17,2 azalmaya neden olmuştur. Yaşam alanı sınırlandırılmış kafes uygulamasının iskelet kasında oksidatif stres belirteçleri üzerine etkisi ilk kez bu çalışmayla değerlendirilmiş olup, immobilizasyona tabi tutulan hayvanların soleus kasında AOPP ve 4-HNE düzeylerinin artırdığı görülmüş, protein karbonil seviyelerinde ise bir değişiklik görülmemiştir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma sıçanda yaşam alanı sınırlandırılmış kafes modeliyle oluşturulan yedi immobilizasyonun soleus kasında oksidatif stres belirteçleri üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmanın sonuçları yedi günlük immobilizasyonun soleus kasında lipid peroksidasyonu ürünlerinden biri olan 4-HNE ve protein oksidasyonunu gösteren AOPP düzeylerini artırırken, protein karbonil düzeylerinde herhangi bir etkisinin olmadığı yönündedir.

Bu bulguların antioksidan savunma sisteminde görev alan SOD, GPX ve CAT gibi enzim aktivitelerinin incelenmesiyle desteklenmesi önerilmektedir.

## 7. KAYNAKÇA

1. Pedersen BK. Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1337-62.
2. Baskin KK, Winders BR, Olson EN. Muscle as a "mediator" of systemic metabolism. *Cell Metab*. 2015;21(2):237-48.
3. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006;33(2):155-65.
4. Ding D, Lawson KD, Kolbe-Alexander TL, Finkelstein EA, Katzmarzyk PT, van Mechelen W, et al. The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases. *Lancet*. 2016;388(10051):1311-24.
5. Kondo H, Kodama J, Kishibe T, Itokawa Y. Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett*. 1993;326(1-3):189-91.
6. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch*. 1993;422(4):404-6.
7. Kondo H, Miura M, Kodama J, Ahmed SM, Itokawa Y. Role of iron in oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch*. 1992;421(2-3):295-7.
8. Kondo H, Miura M, Nakagaki I, Sasaki S, Itokawa Y. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*. 1992;262(5 Pt 1):E583-90.
9. Kondo H, Nakagaki I, Sasaki S, Hori S, Itokawa Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*. 1993;265(6 Pt 1):E839-44.
10. Kondo H, Nishino K, Itokawa Y. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. *FEBS Lett*. 1994;349(2):169-72.
11. Marmonti E, Busquets S, Toledo M, Ricci M, Beltrà M, Gudiño V, et al. A Rat Immobilization Model Based on Cage Volume Reduction: A Physiological Model for Bed Rest? *Frontiers in physiology*. 2017;8:184-.
12. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89-96.
13. Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;46:200-6.
14. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015;4:180-3.
15. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*: Oxford University Press; 2015. p. 0.
17. Davies DJ, Parrott MJ. *Free Radical Reactions*. *Free Radicals in Organic Synthesis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1978. p. 1-14.
18. Wardman P, Candeias LP. Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiation Research*. 1996;145(5):523-31.
19. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*. 2017;11:613-9.
20. Haber F, Weiss J, Pope WJ. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London Series A - Mathematical and Physical Sciences*. 1934;147(861):332-51.
21. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*. 1994;52(8 Pt 1):253-65.

22. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
23. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. 2011. p. 1-37.
24. Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(7):747-58.
25. Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Jr., Thomas JA. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys.* 1994;310(1):273-81.
26. Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lönn ME, Hudemann C, Lillig CH. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 6):1375-7.
27. Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1994;269(47):29382-4.
28. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 2011;1(2):941-69.
29. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003;25(3-4):207-18.
30. Kayalı R, Çakatay U. Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi.* 2004;35(2).
31. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313-6.
32. Lushchak VI, Semchyshyn HM, Lushchak OV. The Classic Methods to Measure Oxidative Damage: Lipid Peroxides, Thiobarbituric-Acid Reactive Substances, and Protein Carbonyls. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* 2011. p. 420-31.
33. Çakatay U, Telci A. Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi.* 2000;63:314-7.
34. Castro JP, Jung T, Grune T, Siems W. 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radical Biology and Medicine.* 2017;111:309-15.
35. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(11-12):1151-63.
36. Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev.* 2014;33(2):79-97.
37. Witko V, Nguyen AT, Descamps-Latscha B. Microtiter plate assay for phagocyte-derived taurine-chloramines. *J Clin Lab Anal.* 1992;6(1):47-53.
38. Selmeçci L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radical Research.* 2011;45(10):1115-23.
39. Gryszczyńska B, Formanowicz D, Budzyń M, Wanic-Kossowska M, Pawliczak E, Formanowicz P, et al. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4975264.
40. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.
41. Bindoli A, Rigobello MP. Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status. *Methods in enzymology.* 2002;347:307-16.
42. Dean RT, FU S, STOCKER R, DAVIES MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal.* 1997;324(1):1-18.



43. Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.* 1997;411(2-3):157-60.
44. Yin H, Xu L, Porter NA. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews.* 2011;111(10):5944-72.
45. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 2003;24(4-5):149-59.
46. Powers SK, Schragger M. Redox signaling regulates skeletal muscle remodeling in response to exercise and prolonged inactivity. *Redox Biol.* 2022;54:102374.
47. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2020;21(7):363-83.
48. Velichkova M, Hasson T. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Molecular and cellular biology.* 2005;25(11):4501-13.
49. Li J, Ichikawa T, Janicki JS, Cui T. Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(7):785-94.
50. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 2011;85(4):241-72.
51. Horie M, Warabi E, Komine S, Oh S, Shoda J. Cytoprotective role of Nrf2 in electrical pulse stimulated C2C12 myotube. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144835.
52. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *The Journal of Physiology.* 2016;594(18):5195-207.
53. Duan F-f, Guo Y, Li J-w, Yuan K. Antifatigue effect of luteolin-6-C-neohesperidoside on oxidative stress injury induced by forced swimming of rats through modulation of Nrf2/ARE signaling pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.
54. Shanmugam G, Narasimhan M, Conley RL, Sairam T, Kumar A, Mason RP, et al. Chronic endurance exercise impairs cardiac structure and function in middle-aged mice with impaired Nrf2 signaling. *Frontiers in Physiology.* 2017;8:268.
55. Chung E, Joiner HE, Skelton T, Looten KD, Manczak M, Reddy PH. Maternal exercise upregulates mitochondrial gene expression and increases enzyme activity of fetal mouse hearts. *Physiological Reports.* 2017;5(5):e13184.
56. Gomez-Cabrera MC, Arc-Chagnaud C, Salvador-Pascual A, Brioché T, Chopard A, Ollaso-Gonzalez G, et al. Redox modulation of muscle mass and function. *Redox Biology.* 2020;35:101531.
57. McClung JM, Van Gammeren D, Whidden MA, Falk DJ, Kavazis AN, Hudson MB, et al. Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med.* 2009;37(4):1373-9.
58. Min K, Smuder AJ, Kwon OS, Kavazis AN, Szeto HH, Powers SK. Mitochondria-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol (1985).* 2011;111(5):1459-66.
59. Powers SK, Hudson MB, Nelson WB, Talbert EE, Min K, Szeto HH, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit Care Med.* 2011;39(7):1749-59.
60. Talbert EE, Smuder AJ, Min K, Kwon OS, Szeto HH, Powers SK. Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. *J Appl Physiol (1985).* 2013;115(4):529-38.
61. Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, et al. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol (1985).* 2009;106(2):385-94.

62. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1251-7.
63. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):333-43.
64. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal.* 1973;134(3):707-16.
65. Kavazis AN, Talbert EE, Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(6):842-50.
66. Bertero E, O'Rourke B, Maack C. Mitochondria Do Not Survive Calcium Overload During Transplantation. *Circ Res.* 2020;126(6):784-6.
67. Tretter L, Takacs K, Kövér K, Adam-Vizi V. Stimulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by calcium in brain mitochondria respiring on alpha-glycerophosphate. *J Neurosci Res.* 2007;85(15):3471-9.
68. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol.* 1985;5:183-9.
69. Ibrahim B, Stoward PJ. The histochemical localization of xanthine oxidase. *Histochem J.* 1978;10(5):615-7.
70. Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Cabo H, Ferrando B, Viña J. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? *Free Radic Biol Med.* 2015;86:37-46.
71. Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Olaso-Gonzalez G, et al. Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PLoS One.* 2012;7(10):e46668.
72. Matuszczak Y, Arbogast S, Reid MB. Allopurinol mitigates muscle contractile dysfunction caused by hindlimb unloading in mice. *Aviat Space Environ Med.* 2004;75(7):581-8.
73. Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie.* 2007;89(9):1107-12.
74. Javeshghani D, Magder SA, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SN. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(3):412-8.
75. Ferreira LF, Laitano O. Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2016;98:18-28.
76. Nuoc TN, Kim S, Ahn SH, Lee JS, Park BJ, Lee TH. The analysis of antioxidant expression during muscle atrophy induced by hindlimb suspension in mice. *J Physiol Sci.* 2017;67(1):121-9.
77. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315-424.
78. Salvayre R, Negre-Salvayre A, Camaré C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie.* 2016;125:281-96.
79. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M, et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(4):809-14.
80. Chung IM, Kim YM, Yoo MH, Shin MK, Kim CK, Suh SH. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis.* 2010;213(1):109-14.
81. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991;40(4):405-12.

82. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23(5):599-622.
83. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.
84. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996;19(3):257-67.
85. Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Möller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 1999;448(1):120-2.
86. Merz KE, Thurmond DC. Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake. *Compr Physiol.* 2020;10(3):785-809.
87. Davì G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation.* 2003;107(25):3199-203.
88. Davì G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f<sub>2</sub>α and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation.* 1999;99(2):224-9.
89. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Jama.* 2006;295(14):1681-7.
90. Cakatay U, Telci A, Salman S, Satman L, Sivas A. Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications. *Endocr Res.* 2000;26(3):365-79.
91. Telci A, Cakatay U, Kayali R, Erdoğan C, Orhan Y, Sivas A, et al. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res.* 2000;32(1):40-3.
92. Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(8):1764-6.
93. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.* 2009;89(1):27-71.
94. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12):931-47.
95. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
96. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004;19(3):169-85.
97. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.
98. Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, et al. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci.* 2009;100(4):715-21.
99. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78(2):547-81.
100. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The Association Between Physical Activity in Leisure Time and Leukocyte Telomere Length. *Archives of Internal Medicine.* 2008;168(2):154-8.
101. Saretzki G, Von Zglinicki T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;959:24-9.

102. Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Kaneko T, Tahara S, Ohno H, et al. Single bout of exercise eliminates the immobilization-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int.* 2001;39(1):33-8.
103. Atherton PJ, Greenhaff PL, Phillips SM, Bodine SC, Adams CM, Lang CH. Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(3):E594-604.
104. Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(2):R337-44.
105. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand.* 1991;142(4):527-8.
106. Petry É R, Dresch DF, Carvalho C, Medeiros PC, Rosa TG, de Oliveira CM, et al. Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: Role of 70 kDa heat shock protein. *Free Radic Biol Med.* 2019;145:87-102.
107. Ghani MA, Barril C, Bedgood DR, Jr., Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem.* 2017;230:195-207.
108. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(4):2005-8.
109. Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C, Desplanches D. Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med.* 2007;42(5):627-35.
110. Koesterer TJ, Dodd SL, Powers S. Increased antioxidant capacity does not attenuate muscle atrophy caused by unweighting. *J Appl Physiol (1985).* 2002;93(6):1959-65.
111. Brocca L, Pellegrino MA, Desaphy JF, Pierno S, Camerino DC, Bottinelli R. Is oxidative stress a cause or consequence of disuse muscle atrophy in mice? A proteomic approach in hindlimb-unloaded mice. *Exp Physiol.* 2010;95(2):331-50.
112. Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, Giannuzzi V, Digennaro C, Dinardo MM, et al. Antioxidant treatment of hindlimb-unloaded mouse counteracts fiber type transition but not atrophy of disused muscles. *Pharmacol Res.* 2010;61(6):553-63.
113. Lawler JM, Song W, Demaree SR. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(1):9-16.
114. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs j.* 2008;275(15):3959-70.
115. Scibior D, Czczot H. [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2006;60:170-80.
116. Auten RL, Davis JM. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatric Research.* 2009;66(2):121-7.
117. Selsby JT, Dodd SL. Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(1):R134-9.
118. Jaspers SR, Fagan JM, Satarug S, Cook PH, Tischler ME. Effects of immobilization on rat hind limb muscles under non-weight-bearing conditions. *Muscle Nerve.* 1988;11(5):458-66.
119. Fitts RH, Metzger JM, Riley DA, Unsworth BR. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol (1985).* 1986;60(6):1946-53.
120. Dirks ML, Wall BT, van de Valk B, Holloway TM, Holloway GP, Chabowski A, et al. One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation. *Diabetes.* 2016;65(10):2862-75.

121. Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(10):1369-74.
122. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(11):1179-84.
123. Akin S, Türkel İ, Özerkliğ B, Demirel H. The role of whole-body vibration on bed rest model-induced skeletal muscle atrophy and fiber type composition: European College of Sport Science; 2020 2022.
124. Marmonti E, Busquets S, Toledo M, Ricci M, Beltra M, Gudino V, et al. A Rat Immobilization Model Based on Cage Volume Reduction: A Physiological Model for Bed Rest? *Front Physiol.* 2017;8:184.
125. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.
126. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
127. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods.* 2012;9(7):671-5.
128. Malavaki CJ, Sakkas GK, Mitrou GI, Kalyva A, Stefanidis I, Myburgh KH, et al. Skeletal muscle atrophy: disease-induced mechanisms may mask disuse atrophy. *J Muscle Res Cell Motil.* 2015;36(6):405-21.
129. Appell HJ. Muscular atrophy following immobilisation. A review. *Sports Med.* 1990;10(1):42-58.
130. Chen YW, Gregory CM, Scarborough MT, Shi R, Walter GA, Vandenborne K. Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. *Physiol Genomics.* 2007;31(3):510-20.
131. Palus S, von Haehling S, Springer J. Muscle wasting: an overview of recent developments in basic research. *Int J Cardiol.* 2014;176(3):640-4.
132. Batt J, dos Santos CC, Cameron JI, Herridge MS. Intensive care unit-acquired weakness: clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(3):238-46.
133. Bloch S, Polkey MI, Griffiths M, Kemp P. Molecular mechanisms of intensive care unit-acquired weakness. *Eur Respir J.* 2012;39(4):1000-11.
134. Stevens RD, Marshall SA, Cornblath DR, Hoke A, Needham DM, de Jonghe B, et al. A framework for diagnosing and classifying intensive care unit-acquired weakness. *Crit Care Med.* 2009;37(10 Suppl):S299-308.
135. Baldwin KM. Effect of spaceflight on the functional, biochemical, and metabolic properties of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28(8):983-7.
136. Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol (1985).* 2007;102(6):2389-97.
137. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;107(4):1198-205.
138. Barclay JK, Hansel M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991;69(2):279-84.
139. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol (1985).* 1992;73(5):1797-804.
140. Vasilaki A, Mansouri A, Van Remmen H, van der Meulen JH, Larkin L, Richardson AG, et al. Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell.* 2006;5(2):109-17.

141. Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech*. 2001;55(4):236-48.
142. Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol (1985)*. 1992;73(5):1805-9.
143. Pellegrino MA, Desaphy JF, Brocca L, Pierno S, Camerino DC, Bottinelli R. Redox homeostasis, oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Physiol*. 2011;589(Pt 9):2147-60.
144. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*. 2005;84(1):1-7.
145. Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol*. 2003;28(4):588-604.
146. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehnopf M, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(21):8665-70.
147. Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, et al. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2009;105(6):861-7.
148. Powers SK, Smuder AJ, Criswell DS. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(9):2519-28.
149. Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166:1369-74.
150. Powers SK, Smuder AJ, Judge AR. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15(3):240-5.
151. Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve*. 2007;35(4):411-29.
152. Li YP, Chen Y, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(4):C806-12.
153. Falk DJ, Deruisseau KC, Van Gammeren DL, Deering MA, Kavazis AN, Powers SK. Mechanical ventilation promotes redox status alterations in the diaphragm. *J Appl Physiol (1985)*. 2006;101(4):1017-24.
154. Whidden MA, Smuder AJ, Wu M, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. *J Appl Physiol (1985)*. 2010;108(5):1376-82.
155. Zergeroglu MA, McKenzie MJ, Shanely RA, Van Gammeren D, DeRuisseau KC, Powers SK. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J Appl Physiol (1985)*. 2003;95(3):1116-24.
156. Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Tarricone E, Vitadello M, Biolo G, et al. A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107(2):549-57.
157. Witko-Sarsat V, Nguyen Khoa T, Jungers P, Druke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1998;28:321-41.
158. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998;161(5):2524-32.
159. Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products: novel uraemic toxins and pro-inflammatory mediators in chronic renal failure? *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(7):1310-2.

160. Kalousova M, Zima T, Tesar V, Lachmanova J. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. *Blood Purif.* 2002;20(6):531-6.
161. Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(2):188-92.
162. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct.* 2006;24(4):307-11.
163. Danzig V, Mikova B, Kuchynka P, Benakova H, Zima T, Kittnar O, et al. Levels of circulating biomarkers at rest and after exercise in coronary artery disease patients. *Physiol Res.* 2010;59(3):385-92.
164. Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, Nagai R, Zhang WR, Liu ZQ, et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(5):1156-62.
165. Bagyura Z, Takacs A, Kiss L, Dosa E, Vadas R, Nguyen TD, et al. Level of advanced oxidation protein products is associated with subclinical atherosclerosis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2022;22(1):5.
166. Jinsmaa Y, Florang VR, Rees JN, Anderson DG, Strack S, Doorn JA. Products of oxidative stress inhibit aldehyde oxidation and reduction pathways in dopamine catabolism yielding elevated levels of a reactive intermediate. *Chem Res Toxicol.* 2009;22(5):835-41.
167. Schaur RJ, Siems W, Bresgen N, Eckl PM. 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules.* 2015;5(4):2247-337.
168. Jaganjac M, Zarkovic N. Lipid peroxidation linking diabetes and cancer; the importance of 4-hydroxynonenal. *Antioxid Redox Signal.* 2022.
169. Bradley MA, Markesbery WR, Lovell MA. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(12):1570-6.
170. Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2006;27(8):1094-9.
171. Selley ML. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(2):169-74.
172. Dalleau S, Baradat M, Gueraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ.* 2013;20(12):1615-30.
173. Akin S, Donmez G, Özdemir M, Demirel H. Does Whole Body Vibration Restore Immobilization-Induced Suppression in AMPK Activation? *Turkish Journal of Sports Medicine.* 2018;53.
174. Rabinovitch RC, Samborska B, Faubert B, Ma EH, Gravel SP, Andrzejewski S, et al. AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell Rep.* 2017;21(1):1-9.
175. Kang C, Goodman CA, Hornberger TA, Ji LL. PGC-1alpha overexpression by in vivo transfection attenuates mitochondrial deterioration of skeletal muscle caused by immobilization. *FASEB J.* 2015;29(10):4092-106.
176. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* 2013;6(1):25-39.
177. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(4):C817-33.
178. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine.* 2009;47(4):333-43.

179. Adhihetty PJ, O'Leary MF, Chabi B, Wicks KL, Hood DA. Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(3):1143-51.
180. Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, et al. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(3):R1159-68.
181. Hytti M, Piippo N, Salminen A, Honkakoski P, Kaarniranta K, Kauppinen A. Quercetin alleviates 4-hydroxynonenal-induced cytotoxicity and inflammation in ARPE-19 cells. *Exp Eye Res*. 2015;132:208-15.
182. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000;289(5488):2363-6.
183. Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett*. 2002;180(1):69-74.
184. Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J*. 1998;12(10):871-80.
185. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127(6):1109-22.
186. Dodd SL, Gagnon BJ, Senf SM, Hain BA, Judge AR. Ros-mediated activation of NF-kappaB and Foxo during muscle disuse. *Muscle Nerve*. 2010;41(1):110-3.
187. Glover EI, Yasuda N, Tarnopolsky MA, Abadi A, Phillips SM. Little change in markers of protein breakdown and oxidative stress in humans in immobilization-induced skeletal muscle atrophy. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2010;35(2):125-33.
188. Pedersen BK. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Muscle-Fat Cross-Talk. *Inflammation Research*. 2010;59:S275-S6.
189. Karstoft K, Pedersen BK. Skeletal muscle as a gene regulatory endocrine organ. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2016;19(4):270-5.
190. Mrowka R, Westphal A. Skeletal muscle in the fight against chronic diseases. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018;223(4):e13086.
191. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;311(4):C537-C43.



## 8. EKLER

## 8.1.Ek-1



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 118

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 27.09.2022 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2022/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2022/53
KARAR NUMARASI	: 2022/08- 07
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 27.09.2027
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Şenay AKIN
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Prof. Dr. Ali Haydar DEMİREL, Doç. Dr. Şenay
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: AKIN, Arş. Gör. İrem GÜNGÖR
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	:
SAYISI	: 32 Adet Wistar Albino Sıçan (3-4 Ay)

Üniversitemiz Spor Bilimleri Fakültesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Şenay AKIN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2022/53 kayıt numaralı "*Tüm Vücut Titreşiminin Kullanılmamaya Bağlı İskelet Kası Oksidatif Hasarı Üzerine Etkisi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

## 8.2. Ek-2

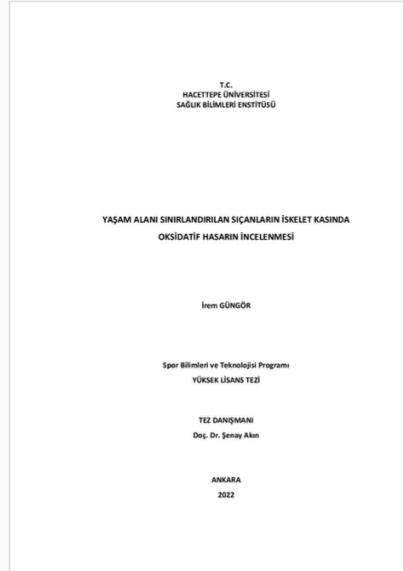


### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: İrem Güngör  
Ödev başlığı: irem tez  
Gönderi Başlığı: YAŞAM ALANI SINIRLANDIRILAN SIÇANLARIN İSKELET KASIN...  
Dosya adı: turnitin.docx  
Dosya boyutu: 4.67M  
Sayfa sayısı: 48  
Kelime sayısı: 9,210  
Karakter sayısı: 66,336  
Gönderim Tarihi: 25-Ara-2022 10:14ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1986562729



## YAŞAM ALANI SINIRLANDIRILAN SIÇANLARIN İSKELET KASINDA OKSİDATİF HASARIN İNCELENMESİ

### ORİJİNALLIK RAPORU

<b>%6</b>	<b>%6</b>	<b>%0</b>	<b>%3</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%5</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Batman University</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>
<b>3</b>	<b>www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>Submitted to Kirikkale University</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Mersin Āniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>
<b>7</b>	<b>www.turkiyeklinikleri.com</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>8</b>	<b>9lib.net</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>9</b>	<b>acikerisim.firat.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>

- 10** [journalofsportsmedicine.org](http://journalofsportsmedicine.org)  
İnternet Kaynağı <% 1
- 
- 11** [www.tuba.gov.tr](http://www.tuba.gov.tr)  
İnternet Kaynağı <% 1
- 
- 12** [dspace.trakya.edu.tr](http://dspace.trakya.edu.tr)  
İnternet Kaynağı <% 1
- 
- 13** [ihslc.mehmetakif.edu.tr](http://ihslc.mehmetakif.edu.tr)  
İnternet Kaynağı <% 1
- 
- 14** [sporbilimleri.hacettepe.edu.tr](http://sporbilimleri.hacettepe.edu.tr)  
İnternet Kaynağı <% 1
- 

Alıntılarını çıkart      üzerinde      Eşleşmeleri çıkar      Kapat  
Bibliyografyayı Çıkart      Kapat

## 9. ÖZGEÇMİŞ