



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI SÜRELERDE UYGULANAN YÜZME
EGZERSİZİNE YANIT OLARAK ORTAYA ÇIKAN OLASI
KAS HASAR VE REJENERASYONUNDA GÖREV ALAN
YOLAKLARIN BELİRLENMESİ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Özgen KILIÇ ERKEK

**Ekim 2019
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI SÜRELERDE UYGULANAN YÜZME
EGZERSİZİNE YANIT OLARAK ORTAYA ÇIKAN OLASI
KAS HASAR VE REJENERASYONUNDA GÖREV ALAN
YOLAKLARIN BELİRLENMESİ**

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Özgen KILIÇ ERKEK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melek BOR-KÜÇÜKATAY

Denizli, 2019

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) “Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar” gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1. Kursunluoglu-Akcilar R, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Turgut S, Bor-Kucukatay M. Apelin induced hemorheological alterations in DOCA-salt hypertensive rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014; 56(1): 75-82.

Ek-2. Findikoglu G, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Senol H, Bor-Kucukatay M. Acute effects of continuous and intermittent aerobic exercises on hemorheological parameters: A pilot study. *Biorheology* 2014; 51(4-5): 293-303.

Ek-3. Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye (Lond)* 2014; 28(3): 285-289.

Ek-4. Isik-Balci Y, Tancer-Elci H, Bor-Kucukatay M, **Kilic-Erkek O**, Kilic-Toprak E, Senol H, Rota S. Investigation of hemorheological parameters at the diagnosis and follow up of children with iron deficiency anemia and mixed anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 60(2): 179-189.

Ek-5. Kilic-Toprak E, Yapici A, **Kilic-Erkek O**, Köklü Y, Tekin V, Alemdaroglu U, Bor-Kucukatay M. Acute effects of Yo-Yo intermittent recovery test level 1 (Yo-YoIR1) on hemorheological parameters in female volleyball players. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 60(2), 191-199.

Ek-6. Tancer-Elci H, Isik-Balci Y, Bor-Kucukatay M, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Senol H, Aybek H. Investigation of hemorheological parameters at the diagnosis and the follow-up of nutritional vitamin b12 deficient children. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 60(3): 273-282.

Ek-7. **Kilic-Erkek O**, Mergen-Dalyanoglu M, Kilic-Toprak E, Ozkan S, Bor-Kucukatay M, Turgut S. Exercise training and detraining process affects plasma adiponectin level in healthy and spontaneously hypertensive rats. *Bratisl Lek Listy* 2015; 116(12), 741-745.

Ek-8. **Kilic-Erkek O**, Kilic-Toprak E, Caliskan S, Ekbic Y, Akbudak İH, Kucukatay V, Bor-Kucukatay M. Detraining reverses exercise-induced improvement in blood pressure associated with decrements of oxidative stress in various tissues in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2016; 412(1-2): 209-219.

Ek-9. Isik-Balci Y, Agladioglu S, Agladioglu K, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Ozhan B, Polat A, Bor-Kucukatay M. Impaired Hemorheological Parameters and Increased Carotid Intima-Media Thickness in Children with Subclinical Hypothyroidism. *Horm Res Paediatr.* 2016; 85(4): 250-256.

Ek-10. Kilic-Toprak E, Toprak I, **Kilic-Erkek O**, Kucukatay V, Bor-Kucukatay M. Increased erythrocyte aggregation in patients with primary open angle glaucoma. *Clin Exp Optom* 2016; 99(6): 544-549.

Ek-11. Ugurlu E, Kilic-Toprak E, Altinisik G, **Kilic-Erkek O**, Cengiz B, Kucukatay V, Senol H, Akbudak IH, Ekbic Y, Bor-Kucukatay M. Increased erythrocyte aggregation and oxidative stress in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2016; 33: 308-316.

Ek-12. Ugurlu E, Kilic-Toprak E, Can I, **Kilic-Erkek O**, Altinisik G, Bor-Kucukatay M. Impaired Hemorheology in Exacerbations of COPD. *Can Respir J* 2017; 1: 286263. (2017). doi: 10.1155/2017/1286263.

Ek-13. Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Abban-Mete G, Caner V, Baris IC, Turhan G, Kucukatay V, Senol H, Kuru O, Bor-Kucukatay M. Contribution of Heme Oxygenase 2 to Blood Pressure Regulation in Response to Swimming Exercise and Detraining in Spontaneously Hypertensive Rats. *Med Sci Monit* 2018; 22(24): 5851-5859.

Ek-14. Unver F, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Korkmaz H, Yasin O, Oymak B, Oskay A, Bor-Kucukatay M. Hemorheological alterations following an acute bout of nordic hamstring exercise in active male participants¹. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018; 463-473.

Ek-15. Kilic-Toprak E, Unver F, **Kilic-Erkek O**, Korkmaz H, Ozdemir Y, Oymak B, Oskay A, Bor-Kucukatay M. Increased erythrocyte aggregation following an acute bout of eccentric isokinetic exercise does not exceed two days. *Biorheology* 2018; 55 (1): 15-24.

Ek-16. Akbudak IH, Kucukatay V, **Kilic-Erkek O**, Ozdemir Y, Bor-Kucukatay M, Investigation of the effects of major ozone autohemotherapy application on erythrocyte deformability and aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2019; 71(3): 365-372.

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Özgen KILIÇ ERKEK tarafından Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY yönetiminde hazırlanan "Farklı Sürelerde Uygulanan Yüzme Egzersizine Yanıt Olarak Ortaya Çıkan Olası Kas Hasar ve Rejenerasyonunda Görev Alan Yolakların Belirlenmesi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

Pamukkale Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY

Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Vildan Caner

Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sanlı Sadi KURDAK

Çukurova Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Gülten ERKEN

Balikesir Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/11/2018 tarih ve 3618 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. HAKAN AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birinci ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Özgen KILIÇ ERKEK

İmza



ÖZET

FARKLI SÜRELERDE UYGULANAN YÜZME EGZERSİZİNE YANIT OLARAK ORTAYA ÇIKAN OLASI KAS HASAR VE REJENERASYONUNDA GÖREV ALAN YOLAKLARIN BELİRLENMESİ

Özgen KILIÇ ERKEK

Doktora Tezi, Fizyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY

Ekim 2019, 103 Sayfa

Egzersizin iskelet kaslarına yararlı etkileri olduğunun bilinmesine rağmen, bu süreçte görev alan sinyal iletim yolları ve yüzme egzersizine yanıt olarak zamana bağlı kas hasar ve rejenerasyon süreçleri aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, farelerde akut ve uzun süreli yüzme egzersizlerine cevaben erken ve geç dönem iskelet kası hasar ve rejenerasyonu ile bunlara aracılık eden sinyal iletim yollarının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. 8-12 haftalık erişkin erkek fareler kontrol ve yüzme grubu olarak 2'ye ayrılmıştır. Egzersiz grupları kendi içlerinde akut ve kronik olarak bölündükten sonra her biri egzersizi takiben deneyin sonlandırılmasına kadar geçecek zaman açısından (3, 24 saat) tekrar 2'ye ayrılmıştır. Akut yüzme egzersizi 30 dk, tek seans; kronik yüzme egzersizi 5 gün/hafta, 6 hafta, 30 dk/gün; olacak şekilde uygulanmıştır. Farelerde alınan kan örneklerinden plazma kreatin kinaz (CK) aktivitesi ticari kit aracılığıyla ölçülmüştür. Gastrocnemius-soleus kaslarından histolojik olarak kas hasar ve rejenerasyonu değerlendirilmiştir. Kas örneklerinden izole edilen RNA'lar ile Whole-transkriptom analizi gerçekleştirilmiş ve sonrasında verilerin doğrulanması amacı ile gerçek-zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. Egzersiz gruplarında kas hasarı yüzdesi, H-skoru ve lökosit infiltrasyonu kontrole göre yüksek olarak bulunmuştur. Ancak; akut 3 saat, akut 24 saat ve kronik 3 saat gruplarındaki artışlar istatistiksel olarak önemli düzeydeyken kronik 24 saat grubunda her üç parametredeki artış istatistiksel olarak önemli düzeye ulaşmamıştır. Plazma CK aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır. Whole transkriptom analizi sonuçlarına göre tüm egzersiz gruplarında *Car3*, *Neb*, *Obecn*, *Ttn*, *Igfbp5*, *Igfbp7*, *Gsk3β* ve *Usp2* genlerinin kontrole göre down-regüle olduğu tespit edilmiştir. Whole-transkriptom analizinde en dramatik ekspresyon değişimleri gözlemlenen 3 gene ait veriler gerçek-zamanlı kantitatif PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Bulgular eşliğinde literatürden yararlanılarak yüzme egzersizlerine cevaben ifadeleri değişen hedef sinyal iletim yolları çizilmiştir. Veriler, uygulanan egzersiz protokollerinin m. gastrocnemius-soleus kas kompleksinde kas hasarına sebep olduğunu ve miyofibrilogenezi uyardığını göstermektedir. Örnekler egzersizleri takiben 3. ve 24. saatlerde alınmış; ancak bu süreler miyofibrilogenez gelişimi için yeterli olmamıştır.

Anahtar kelimeler: Yüzme egzersizi, iskelet kas hasarı, kas rejenerasyonu, transkriptom

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017SABE014).

ABSTRACT**DETERMINATION OF THE PATHWAYS IN PONTENTIAL MUSCLE DAMAGE AND REGENERATION IN RESPONSE TO SWIMMING EXERCISE IN DIFFERENT TIMES**

KILIC ERKEK, Ozgen

PhD Thesis in Physiology

Supervisor: Prof. Melek BOR-KUCUKATAY (MD, PhD)

October 2019, 103 Pages

Although exercise is known to have beneficial effects on skeletal muscles, signaling pathways involved in this process and time-dependent muscle damage and regeneration processes in response to swimming exercise have not been elucidated. The aim of this study was to investigate early, late skeletal muscle damage, regeneration and the signaling pathways involved in response to acute, prolonged swimming exercises. 8-12 weeks old male mice were divided as control, swimming. Each exercise group was further divided in terms of time (3, 24 hours) passed from the last exercise session till the end of the experiment. Acute exercise was applied as 30 min, one session, chronic group swam 5 days/week, 6 weeks, 30 min/day. Plasma creatine kinase (CK) activity was measured by a kit. Muscle damage and regeneration of gastrocnemius-soleus muscles were evaluated histologically. Whole-genome gene expression analysis was applied to total RNA samples isolated from mice gastrocnemius-soleus muscle complexes. Quantitative real-time PCR was used to validate the microarray data. Percentage of muscle damage, H-score, leukocyte infiltration were higher in exercise groups compared to control. Increases in acute 3 hour, acute 24 hour, chronic 3 hour groups were statistically significant, in chronic 24 hour group wasn't significant. No alteration was observed in plasma CK activity. *Car3*, *Neb*, *Obscn*, *Ttn*, *Igf1p5*, *Igf1p7*, *Gsk3 β* and *Usp2* were downregulated in all exercise groups compared to control. Expression changes of 3 genes which demonstrated most dramatic expression changes in whole-transcriptome analysis were confirmed by real-time quantitative PCR. Based on the findings and literature, the signaling pathways involved in skeletal muscle damage and regeneration in response to swimming exercise were drawn. The results demonstrate that, swimming exercise causes muscle damage and myogenesis. Samples were taken at 3 and 24 hours following the exercises; however, these times were not sufficient for the development of myofibrillogenesis.

Keywords: Swimming exercise, skeletal muscle damage, muscle regeneration, transcriptom

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2017SABE014.

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın ilk gününden itibaren bana yol gösteren, iyi bir akademisyen olabilmem için sabır ve özveriyle yetiştiren, hayatım boyunca manevi olarak yeri hep anlamlı ve özel kalacak olan canım hocam danışmanım Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY'a, doktora öğrenimim esnasında tüm katkılarından dolayı ve tez çalışmam sürecinde yardımlarını esirgemeyerek kritik yorumlarını paylaşan hocalarım Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY'a, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN'a ve akademik hayatın bana kazandırdığı sevgili Dr. Öğr. Üyesi Emine KILIÇ TOPRAK'a, tez çalışmam sürecinde yardımlarını esirgemeyen, tezimin deneysel aşamalarında yardımcı dokunan ve kritik yorumlarını paylaşan hocalarım Prof. Dr. Gülçin Abban Mete ve Prof. Dr. Vildan Caner'e, tezimin deneysel aşamalarında benden desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Cansu Barış'a, sonsuz sabır ve destekleri için asistan arkadaşlarıma ve dostlarıma, hayatımın her anında manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve bana olan desteği kelimelerle anlatılmayacak kadar çok olan değerli eşim Emre ERKEK'e ve sevgisiyle güç veren minik kelebeğim, biricik masum meleğim Bade'ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Saygılarımla

Ekim - 2019

Özgen KILIÇ ERKEK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI	3
2.1 İskelet kası	3
2.1.1. Gelişimi ve fizyolojisi	3
2.1.1.1. Embriyogenez	3
2.1.1.2. İskelet kası erişkin kök hücreleri	3
2.1.1.3. İskelet kası gelişiminde genetik faktörler	4
2.1.1.4. İskelet kasının morfolojisi	5
2.1.1.5. İskelet kasının mikroskopik görünümü	7
2.1.1.6. İskelet kas proteinlerinin moleküler yapısı	8
2.1.1.7. İskelet kası kasılması	12
2.1.1.7.1. Uyarılma-kasılma eşleşmesi	12
2.1.1.7.2. Kasılma mekanizması (çapraz köprü döngüsü)	13
2.1.1.8. İskelet kas lifi tipleri	14
2.2. Kas hasar ve onarımı	15
2.2.1. Kas hasar belirteçleri	17
2.3. Egzersiz	19
2.3.1. Yüzme egzersizi	20
2.3.2. Egzersize bağlı kas hasarı ve onarım süreçleri	20
2.4. Hipotez	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması	26
3.2. Yüzme Egzersizi	27
3.3. Deneyin sonlandırılması, doku ve kan örneklerinin alınması	27
3.4. Histolojik incelemeler için doku örneklerinin hazırlanması	27
3.5. Kas hasarının Histolojik olarak belirlenmesi	29
3.6. Histolojik olarak kas rejenerasyonu değerlendirilmesi	29
3.7. Plazma CK aktivitesi ölçümü	29
3.8. Total RNA İzolasyonu	30
3.9. Whole-Transkriptom Analizi	31
3.10. Mikroarray verilerinin verifikasyonu;	39
3.11. Hedef Sinyal İletim Yolaklarının Belirlenmesi	40
3.12. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. Histolojik incelemeler	42
4.2. Plazma CK aktivitesi İncelemeleri	45
4.3. Whole transkriptom analiz verileri	45
4.4. Mikroarray analiz verilerinin validasyonu	50
4.6. Hedef sinyal iletim yolağının çizimi	53
5. TARTIŞMA	54

6. SONUÇLAR	66
7. KAYNAKLAR	67
8.ÖZGEÇMİŞ	86
9. EKLER	87



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 İskelet kasının morfolojisi	6
Şekil 2.2 İskelet kasında T-tübülü ve ilişkili yapılar	7
Şekil 2.3 İskelet kasının gevşek ve kasılı olduğu durumda sarkomerin yapısı	8
Şekil 2.4. Miyozin filament yapısı	8
Şekil 2.5. Aktin, troponin ve tropomiyozin moleküllerinin yapısı	9
Şekil 2.6 α -aktin'in miyojenik farklılaşmada rolü	10
Şekil 2.7 İskelet kası proteinleri	11
Şekil 2.8 Motor ünite	12
Şekil 2.9 Uyarılma-kasılma eşleşmesi	13
Şekil 2.10 Çapraz köprü döngüsü	14
Şekil 2.11. İki temel egzersiz tipinin iskelet kasına etkisi	20
Şekil 2.12 Fiziksel aktiviteye yanıt olarak uydu aktivasyon proliferasyon ve farklılaşması	23
Şekil 3.1 Deney gruplarının şematik gösterimi	27
Şekil 3.2 Magnetik Seperasyon Rack'ı kullanılarak, magnetik pürifikasyon boncukları yardımı ile RNA örneklerinin ependorf tüplerindeki görünümü	33
Şekil 4.1 Kontrol ve egzersiz gruplarından alınan Gastrocnemius-soleus kas kompleksine ait kesitler.	43
Şekil 3.3 Mikroarray chip'lere örneklerin yüklenmesi	38
Şekil 3.4 Mikroarray chiplerin hibridizasyon fırınında inkübe edilmesi ve yıkanması	38
Şekil 4.2 Grupların kas hasarı yüzdeleri	43
Şekil 4.3 H-skoruna göre kas hasarı belirlenmesi	44
Şekil 4.4 Deney gruplarında gözlenen lökosit infiltrasyonu	44
Şekil 4.5 Grupların plazma CK aktivite düzeyleri	45
Şekil 4.6 Normalizasyon sonrası elde edilen verilen ortak bir meridyende toplandıklarını gösteren Signal box plot grafiği	45
Şekil 4.7 PCA (principal component analysis) analizleri ile örneklerin dağılımı	46
Şekil 4.8 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında egzersize yanıt olarak ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlenen genlere ait heat map.	50
Şekil 4.9 Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi <i>Acta1</i> geni mRNA ekspresyon düzeyleri	51
Şekil 4.10 Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi <i>Cyca</i> geni mRNA ekspresyon düzeyleri	52
Şekil 4.11 Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi <i>Tnni2</i> geni mRNA ekspresyon düzeyleri	52
Şekil 4.12 Uygulanan yüzme egzersizi protokolününü takiben 3 saat ve 24 saatte alınan örneklerde egzersize cevap olarak ifadeleri değişen genler ile çizilen hedef sinyal iletim yolları	53
Şekil 5.1 IGF-Akt yolağı	60
Şekil 5.2 Egzersiz ile oluşan kas hasarını takiben miyofibrillerin yeniden şekillenmesi basamakları	62

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İskelet kasındaki farklı lif tiplerinin yapısal, metabolik ve işlevsel karşılaştırılması	15
Tablo 3.1 aRNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri	34
Tablo 3.2. ss-cDNA miktarları	36
Tablo 4.1 Akut 3 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	47
Tablo 4.2 Akut 24 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	48
Tablo 4.3 Kronik 3 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	48
Tablo 4.4 Kronik 24 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	49
Tablo 4.5 Akut 3 saat ile kronik 3 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	49
Tablo 4.6 Akut 24 saat ile kronik 24 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	49
Tablo 4.7 Akut 24 ile akut 3 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	49
Tablo 4.8 Kronik 24 ile kronik 3 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
A bantlarını	Anizotropik bant
Ach	Asetilkolin
ACSM	Amerikan Spor Tıp Enstitüsü
ACTA	Aktin, alfa 1, iskelet kası
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
Ca^{+2}	Kalsiyum
CA3	Karbonik anhidraz 3
CK	Kreatin kinaz
CK-BB	CK beyin
CKM	Kreatin kinaz, kas
CK-MB	CK kalp kası
CO_2	Karbondioksit
CSRP	Sistin proteini zengin aile üyeleri
Cu^{+2}	Bakır
cyc	Sitokrom c
DHPR	Voltaj duyarlı dihidropiridin reseptörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ETS	Elektron taşıma zincirindeki
FAPs	Fibro/Adipojenik progenitörler
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
I bandını	İzotropik bant
IGF1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-1R	IGF1 reseptörü
IGF-2	İnsülin benzeri büyüme faktörü-2
IGFBP	IGF bağlayıcı protein
Igfbp5	İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 5
Igfbp7	İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 7
IL-6	İnterlökin 6
K^+	Potasyum
LIF	Lösemi inhibe edici faktör
MSC	Mezenşimal kök hücre
Na^+	Sodyum
NDUFB9	NADH dehidrogenaz (Ubikinon) 1 beta subkompleks, 9
Neb	Nebulin
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B () transkripsiyon faktörünün
Obscn	Obskurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
Pax	Paired-box transkriptör faktörler
PDGF	Trombosit-kaynaklı büyüme faktörü
Pi	İnorganik fosfata
PW1 ⁺	İnterstisyel kök hücreler
qRT-PCR	Kantitatif reverse transkriptaz PCR
ROS	Reaktif oksijen türleri
RyR	Riyanodin reseptörleri
SERCA	Ca^{+2} ATPaz
SP	Side population hücreler
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü-beta
Tip I	Kırmızı lifler

Tip II	Beyaz lifler
Tip IIa	Hızlı oksidatif glikolitik lifler
tip IIx/b	Hızlı glikolitik lifler
TNF- α	Tümör nekroze edici faktör-alfa
TnnC	Troponin kompleksinin troponin C
TnnI	Troponin I
Tnni2	Troponin I, iskelet, hızlı 2
Tnnt	Troponin T
Tnnt1	Yavaş iskelet kas troponin T
Tnnt2	Kardiyak kas troponin T
Tnnt3	Troponin T3, iskelet, hızlı
Ttn	Titin
T-tübülleri	Transvers tübüller
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü



1. GİRİŞ

Erişkin insan vücudunun ağırlığının yaklaşık %40'ını iskelet kası oluşturmaktadır, bu nedenle iskelet kası insan vücudunun en büyük organıdır (Hoppeler 1990). İskelet kası istemli ve koordineli vücut hareketlerinden sorumlu olup, aynı zamanda miyokin adı verilen bir grup maddeyi de salgılayarak homeostazise katkı sağlar (Pedersen ve Febbraio 2012). İskelet kası hipertrofi, atrofi, yeniden şekillenme, rejenerasyon gibi önemli özelliklere de sahiptir (Wolfe 2006). Yaşam kalitesinin sürdürülmesinde iskelet kas kitlesinin korunması ve geliştirilmesi kritik öneme sahip olup, bu sebeplerle egzersizin kas kitlesi ve fonksiyonları üzerindeki etkilerinin ortaya konması yoğun ilgi gören bir çalışma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Hareket, bir grup motor nöronun bilinçli aktivasyonu ile gerçekleşen büyük oranda istemli bir olaydır. Egzersizin sarkomer sayısı, miyofibril içeriği ve dolayısıyla kas gücünde artışa sebep olduğu bilinmektedir. Tekrarlayan kas kasılmaları dayanıklılığın artmasına yol açan uzun süreli adaptasyonları uyarır (Boppart vd 2013, Kraemer ve Castracane 2015). Öte yandan, egzersizin tipi, şiddeti, sıklığı ve süresine bağlı olarak kas hasarı meydana gelebilmektedir. Egzersiz ile gelişen kas hasarında Z bantlarında ayrılmalar ve miyofibril yapılarında bozulmalar görülür ve membran yapısı bozularak kas içi enzim ve proteinlerin (kreatin kinaz-CK, karbonik anhidraz 3-CA3, troponin I, 2-tnni2 gibi) hücre dışına sızmasına neden olabilir (Hornemann vd 2000, Fu vd 2009, Chapman vd 2013). Egzersize cevaben gelişen kas hasar/rejenerasyon süreçleri birbiri ile iç içe geçmiş kompleks bir grup reaksiyonlar dizisi olarak ele alınabilir (Burd ve De Lisio 2017). Literatürde özellikle akut eksantrik egzersiz protokollerine bağlı olarak gelişen kas hasarının miyofibrilin yeniden şekillenmesine yol açabildiği gösterilmiştir (Teran-Garcia vd 2005, Bellafiore vd 2007, Lehti vd 2007). Egzersiz protokollerini takiben sarkomerde α -aktinin, titin, nebulin, obskurin gibi protein kayıpları gözlenebilmektedir. Bu olayı aktin filamentlerinde uzama, α -aktinin, titin ve nebulin proteinlerinin reintegrasyonu ve dolayısıyla sarkomer oluşumu takip edebilmektedir (Yu vd 2003). Egzersizin herhangi bir parametre üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda uygulanan egzersizin türü, sıklık/süre/şiddeti ve egzersizden

sonraki örnek toplama zamanı önemli değişkenler olarak göz önüne alınmalıdır. Yüzme egzersizi kolay uygulanabilen, çok fazla kas grubunu çalıştıran bir egzersiz türüdür. Su yüzeyinde yapıldığından alt ekstremiteye binen yük çok fazla olmaz ve bu sebeplerle yüzme pek çok kişiye rahatlıkla önerilebilir ve hastalar tarafından nispeten kolay tolere edilebilir. Hayvanlar için de yüzme doğal bir davranış modelidir (Arshadi vd 2015),

İskelet kası tamiri; etkin yeniden şekillenme (remodeling), doku bütünlüğünün idamesi ve egzersizi takiben gelişen adaptasyon süreci için önem arz etmektedir (Boppart vd 2015). İskelet kası erişkin kök hücreleri satelit (uydu) hücreler ve uydu olmayan veya mezenşimal kök hücreler (MSC'ler) olarak 2'ye ayrılabilir (Boppart vd 2013). Egzersize cevap olarak meydana gelen iskelet kası rejenerasyonu ağırlıklı olarak satelit hücrelere atfedilmiştir. Satelit hücreler hasar oluşturucu bir uyarı karşısında aktive ve proliferasyon olarak doku rejenerasyonunda etkin rol oynarlar (Hawke ve Garry 2001, Macaluso ve Myburgh 2012). Öte yandan, iskelet kasında yerleşmiş olan bir grup MSC'nin de egzersizle uyarılan kas onarımına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Valero vd 2012, Huntsman vd 2013, De Lisio vd 2014). Post-egzersiz miyogenezde MSC'ler hücre uyarımına cevap olarak meydana gelen satelit hücre aktivasyonu ve bu süreçte bir takım büyüme faktörlerinin rolüne işaret eden güncel veriler mevcuttur (Macaluso ve Myburgh 2012). Hyldahl ve arkadaşları tek bir ekzantrik egzersiz seansını takiben 3 saat sonra nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aktivitesinde ve interlökin-6 (IL-6), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) gibi NF- κ B yolağı ile ilişkili sitokinlerin miktarında artış tespit etmişlerdir (Hyldahl vd 2011). Öte yandan, bu konuda çelişkili veriler de ileri sürülmüştür (Tantiwong vd 2010, Durham vd 2004). Yakın zamanda yayınlanan bir başka çalışmada direnç egzersizinin fosfatidil inositol 3 kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt) yolağı ile ilişkisi ortaya konmuştur (Dickinson vd 2018). Bununla beraber, kısa ve uzun süreli egzersize yanıt olarak iskelet kası erişkin kök hücre yanıtları ve egzersizle uyarılan/inhibe olan başka olası yollar ve bunlar arasındaki etkileşim net olarak ortaya konmamıştır. Kas hasar/rejenerasyonu zamana bağlı gelişen süreçler olduğundan bu olaylarda görevli mekanizma ve yolların aydınlatılmasında egzersizi takiben örnek toplama zamanı önem kazanmaktadır.

1.1. Amaç

Yukarıdaki bilgiler ışığında mevcut doktora tezi kapsamında, kısa ve uzun süreli yüzme egzersizlerini takiben m. gastrocnemius-soleus kompleksinde zamana bağlı hasar ve rejenerasyonun belirlenmesi ve bu süreçlerde görev alan olası sinyal iletim yollarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI

2.1. İSKELET KASI

2.1.1. Gelişimi ve Fizyolojisi

2.1.1.1 Embriyogenez

Embriyogenez sürecindeki moleküler etkileşimler kas gelişimi ve rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır. Kas oluşumu erken embriyogenez esnasında paraksial mezodermden kaynaklanır (Buckingham vd 2003). Paraksial mezoderm segmentlere ayrılır ve epitelyal kürelerden oluşan somitler nöral tüpü oluşturur. Somit özellikler dermomiyotomu oluşturur. Dermomiyotom ise dorsalde lokalize olup gövde ve ekstremitelerin derisi ile iskelet kasını oluşturur (Miller vd 1999, Pirskanen vd 2000). Progenitörler dermomiyotomdan epiaksial bölgenin dorsomedialine kasları oluşturmak üzere göç ederler (Ordahl vd 2000). Bitişik notokord, nöral tüp ve lateral plak mezoderminde progenitör hücrelerin gen ekspresyonları hücre döngüsü ve farklılaşmasıyla birbirinden ayrılır. Buna ek olarak proliferasyon hücreleri dermomiyotomdan direkt olarak miyotoma göç ederler ve MyoD ailesine ait farklılaşma belirteçleri eksprese olmadan proliferasyona başlarlar (Relaix vd 2005).

2.1.1.2. İskelet kası erişkin kök hücreleri

İskelet kası erişkin kök hücreleri satellit (uydu) ve mezenşimal kök hücreler (MSC)- (uydu olmayan kök hücreler) olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Uydu hücreleri kasa özgü kök hücreler olup, sarkolemma ve bazal lamina arasındaki nişte bulunurlar. Normal şartlar altında mitotik olarak sessiz, küçük çekirdekli, bol sitoplazmalı, az miktarda organel içeren ve erişkin tipi Pax 7⁺ progenitör hücrelerdir (Fry vd 2014). Uydu hücrelerinin yaşla birlikte kas kitlesinin korunumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Fry vd 2017). Hücre döngüsünün G0 fazında (dinlenme fazı) mitotik olarak sessiz

duran bu hücreler embriyonal miyogenezde rol alan transkripsiyon faktörlerinin yönlendirmesi ile aktive olur, çoğalır, bir kısmı kendini yeniler ve bir kısmı da farklılaşırlar (Murphy vd 2011). Uydu hücreleri G0 fazında Pax7 ve Myf5, aktive olduklarında miyojenik düzenleyici faktörler Myf5 ve MyoD eksprese ederler. MyoD miyoblastların proliferasyon basamağında, farklılaşma ve kas fibriline füzyonda önemli rol oynar (Wosczyzna vd 2012). Buna karşılık Myf5 ekspresyonu, uydu hücrelerinin sürekli olarak sayıca korunmasında önemlidir (Baroffio vd 1996).

Mezenşimal kök hücreler (MSC) Uluslararası Hücre Terapisi Derneği tarafından iğ-şeklinde, plastiğe yapışan, Sca-1⁺CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, veya CD11b⁻, CD79⁻, veya CD19⁻, ve HLA-DR⁻, multipotent hücreler olarak tanımlanmaktadır (Dominici vd 2006, Huntsman vd 2013). Side population (SP) hücreler, mezenşimal progenitörler, perisitler, kastan türemiş kök hücreler, fibro/adipojenik progenitörler (FAPs), ve interstisyel kök hücreler (PW1⁺) iskelet kasından izole edilmiş Pax7⁻ (MSC), multipotent kök hücrelerdir (Qu-Petersen vd 2002, Motohashi vd 2008, Joe vd 2010, Mitchell vd 2010, Uezumi vd 2010, Doyle vd 2011, Valero vd 2012). MSC'lerin özelleşmiş yeni hücre grupları oluşturulabilme potansiyelleri ve daha da fazlası konakçıda immün yanıt oluşturmama özellikleri (Keating 2006), bu hücrelerin tedavide olası kullanım alanları üzerindeki ilginin artmasına yol açmıştır. MSC'lerin VEGF, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve insulin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), IL-6, epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi faktörleri sentezleyip salabilme özellikleri tespit edilmiştir (Gnecchi vd 2006, Valero vd 2012, Huntsman vd 2013). Bu durum, hasara uğrayan doku tarafından salgılanan -henüz net olarak tanımlanamamış- bazı faktörlere cevaben MSC'lerce salınan lokal veya sistemik faktörlerin uydu hücre aktivasyonu ve dolayısıyla doku rejenerasyonunda etkin rol oynuyor olabileceği yönündeki hipotezin kurulmasına neden olmuştur (Boppart vd 2013).

2.1.1.3. İskelet kası gelişiminde genetik faktörler

İskelet kası gelişiminde rol oynayan temel transkripsiyon faktörleri olan MyoD, Myf5, myogenin, ve Myf6 miyogenezin moleküler kaskadını regüle ederler (Weintraub 1993). MyoD ailesinin üyeleri somitlerden eksprese edilirler ve embriyogenez sürecinde iskelet kasını oluşturular. Gen parçalama teknolojileri ile MyoD ailesine ait üyelerin miyogenez sürecindeki önemi gösterilmiştir (Braun vd 1992, Rudnicki vd 1992, Zhang vd 2018). Son dönemlerde yapılan çalışmalar MyoD, Myf5 ve Myf6'nın iskelet kası belirteci olarak ele alınabileceğini, bununla birlikte tek ve çift mutant embriyoların iskelet kası gelişiminde genetik hiyerarşide Myf5 ve Myf6'nın MyoD'den daha üstte olduğunu

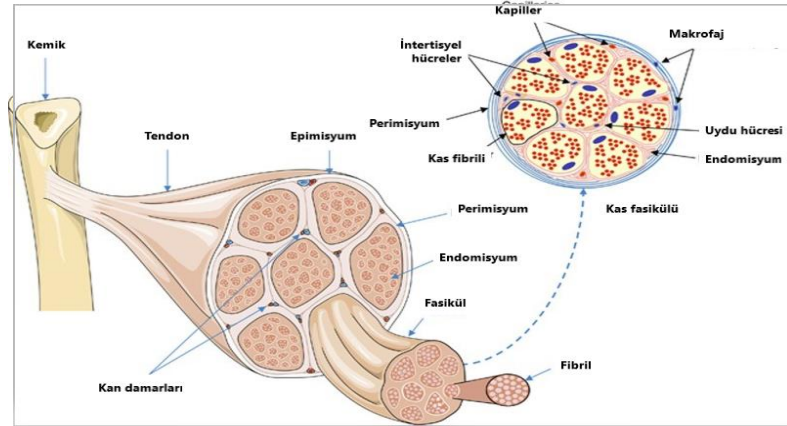
göstermiştir (Kassar-Duchossoy vd 2004). Myf4 ise kas gelişiminde miyogeninin inaktivasyonu sonucunda kas farklılaşmasını baskılar ve neonatal ölümlere neden olur (Hasty vd 1993, Nabeshima vd 1993). Paired-box (Pax) transkriptör faktörler de miyogenezde önemli rol oynar. Pax3 embriyo gelişiminde hipaksiyal dermomiyotom, nöral tüp ve nöral krest oluşumunu sağlar. Pax3 geninde mutasyon ve nöral tüp defekti, nöral krest defekti, somit defekti oluşmuş Splotch fareler ile yapılan çalışmalarda, kas progenitör hücrelerin migrasyonunda hasar ve kaslarda güçsüzlük gözlemlenmiştir (Goulding vd 1994, Borycki vd 1999). Pax3 tirozin kinaz reseptörünün transkripsiyonel aktivatör olduğu, kas progenitör hücrelerinin delaminasyon ile migrasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (Tajbakhsh vd 1997, Dietrich vd 1999, Brohmann vd 2000). Pax3 MyoD ailesi üyelerinden genetik olarak daha üsttedir (Maroto vd 1997, Tajbakhsh vd 1997). Pax3 ve Pax7 ise birbirinin paraloğudur. İskelet kası gelişiminde Pax3'e ait fonksiyonlar Pax7'de de görülebilir (Relaix vd 2004).

2.1.1.4. İskelet kasının morfolojisi

Erişkin insan ağırlığının yaklaşık yarısını iskelet kası oluşturmaktadır. İskelet kası, iskelet ile kurmuş olduğu bağlantı sayesinde istemli ve koordineli vücut hareketlerini sağlar (Wolfe 2006). Otonom sinir sisteminin uyarıları ile istemsiz kasılan düz kas ve kalp kasının aksine iskelet kası somatik sinir sisteminden aldığı uyarılarla istemli olarak kasılmaktadır. Hareket yeteneğini sağlamanın yanı sıra vücut postürünün korunması, solunum ve dolaşım gibi yaşamsal işlevlerde görev almaktadır (Bladt vd 1995, Kierszenbaum 2006). Kas lifleri, 10-100 µm çapında ve 80 cm'ye kadar uzayabilen uzun kas hücreleri olup, her bir kas lifi kasın bir ucundan diğer ucuna uzanan çok çekirdekli bir kasılma ünitesidir. Bol damarlı ve sınırlı bir yapıya sahip olan iskelet kası, demetler halinde ve zarla sarılmış olarak bulunur. Bu zarlar, buldukları yerlere göre epimisyum, perimisyum ve endomisyum olarak adlandırılırlar (Frontera ve Ochala 2015).

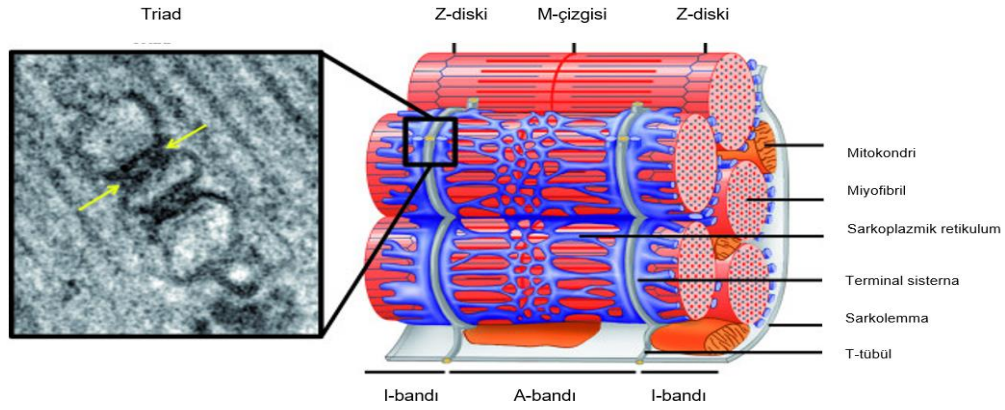
İskelet kasları organizmanın kasılma birimleri olup, kemiklerin periosteumuna fasyalar aracılığıyla tendonlarla bağlanırlar. Kas yapısı, fasyaların farklı katmanları ile çevrelenmiştir, en dış tabaka, bir bütün olarak organı çevreleyen bağ dokusu tabakası olan epimisyumdur. Perimisyum, miyositleri içeren kas liflerinden oluşan çok sayıda fasikülleri çevreler (Thomas 2013). Fasiküller, endomisyum ile çevrelenmiş çok sayıda kas lifi içerir. Endomisyum, kas liflerini tek tek ayırır ve hücre zarına en yakın olan, destekleyici bir ağ olarak işlev gören bazal membrana kas liflerini bağlar (Schleip vd 2012). Her kas lifi çok sayıda kasılabilen birbirine paralel uzanan miyofibrilden oluşur (Şekil 2.1). Her bir miyofibril ise ince ve kalın olmak üzere iki farklı yapıda

miyofilamentlerden oluşur. Kalın filamentler miyozin proteininin büyük polimerlerini temsil eder: İnce filamentler aktin, tropomiyozin ve troponinden oluşur (Gordon vd 2000).



Şekil 2.1 İskelet kasının morfolojisi (Sciorati vd 2016)

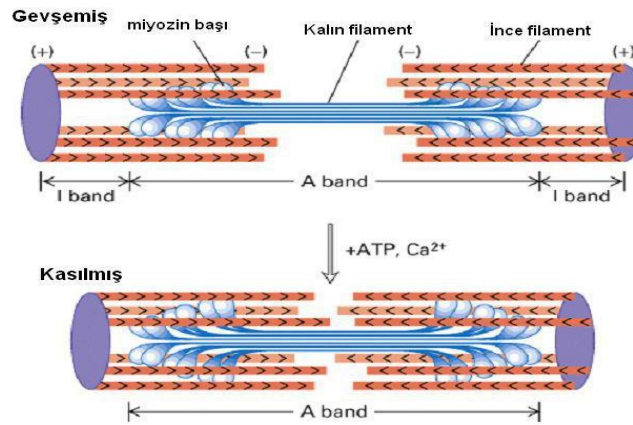
İskelet kası hücrelerinin membranına sarkolemma, sitoplazmasına sarkoplazma, endoplazmik retikulumuna sarkoplazmik retikulum adı verilir (Voeltz vd 2002). Kas lifleri çok sayıda çekirdek içerir ve çekirdekler sarkolemma'nın altında eksantrik olarak yerleşmiştir. Sarkolemma ekstraselüler sıvıya uzanır ve hücre içerisine invajinasyonlar yaparak tübüler yapıları oluşturur (Huxley ve Taylor 1958). Ekstraselüler sıvıyla temas halinde olan bu tübüler yapılar parmak benzeri çıkıntılarla sarkoplazmaya uzanır ve transvers tübüller (T-tübülleri) olarak adlandırılır. T-tübülleri kasılma için gerekli olan Ca^{+2} 'dan zengin sarkoplazmik retikulumun membranöz kanalları ile temas halindedir. Sarkoplazmik retikulum, longitudinal tübüller adı verilen enine tübüllerden ve terminal sisterna adı verilen büyük bölmelerden oluşur (Flucher 1992). T-tübülü ve T-tübülünün her iki yanında yer alan terminal sisternaların oluşturduğu yapıya triat adı verilir (Şekil 2.2). Uyarılar T-tübülleri ile sarkolemma boyunca hücre içerisine iletir. İletilen uyarılar terminal sisterna ve longitudinal tübüllerde yer alan Ca^{+2} kanallarını açarak sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} 'un salınması sağlar (Franzini-Armstrong 1994). Sarkoplazma sodyum (Na^{+}), potasyum (K^{+}), kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum gibi elektrolitleri, glikojeni, oksijeni depolamak ve taşımak için miyoglobini, enerji kaynaklarını mobilize eden kreatin kinazı (CK), mitokondri gibi organelleri içerir. Mitokondri adenosin trifosfat (ATP) üretir ve kasılma sırasında gerekli olan enerjiyi sağlar (Beigneux vd 2004).



Şekil 2.2 İskelet kasında T-tübülü ve ilişkili yapılar (Marieb-Elaine 2007)

2.1.1.5. İskelet kasının mikroskopik görünümü

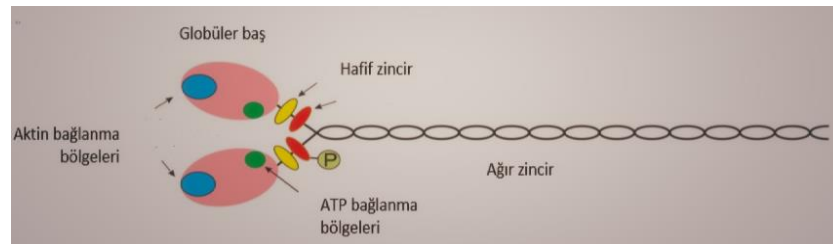
İskelet kası elektron mikroskopunda incelendiğinde açık ve koyu bantlar şeklinde çizgilenmeler görülür. Bu çizgilenmeler aktin ve miyozin molekülleri ve bunlar arası etkileşimlerce oluşturulur. Miyozin molekülleri birleşerek miyozin filamentlerini oluşturur ve polarize ışığı çift kırma özelliklerinden dolayı koyu renkli görünüme sahip A bantlarını (anizotropik bant) oluştururlar (Lange vd 2005). Aktin, troponin ve tropomiyozin moleküllerinden oluşan aktin filamenti ışığı tek kırma özelliği ile açık renkli görünüme sahip I bandını (izotropik bant) oluşturur (Gordon vd 2000). Dinlenme durumunda kas gevşek olarak bulunduğu anda aktin filamentleri miyozin filamentlerinin ucunu örter; ancak A bandının orta kısmını örtmez ve burası saf miyozin bölgesidir. Bu bölge nispeten daha açık renkli olan H bandını oluşturur. Kasılan bir kasta aktin filamentleri miyozin filamentlerinin üzerinde kayar ve H bandı ortadan kalkar; koyu bir A bandı kalır (Craig ve Padron 2004). Dinlenimde H bandı ve kasılma evresinde ise A bandının tam ortasında miyozin moleküllerinin kuyruklarının birbirine bağlandığı alan koyu bir çizgi olarak görünür; buna M çizgisi adı verilir. I bantları orta noktalarından enine Z bandı ile ayrılır. Aktin ile miyozinler Z bandına tutunarak bir düzen halinde dizilirler (Yamada vd 2003). Sarkomerler miyofilament adı verilen protein yapısındaki kasılabilir yapılardan oluşan, iki komşu Z çizgisi arasında bulunan yapılardır. Kasın fonksiyonel ünitesi olan sarkomer, miyofibrillerin sonlandığı kısımlarda interaktif ve organize bir şekilde dizilen proteinleri içeren bir yapıdır. Sarkomer bir A bandı ve iki yarım I bandından oluşur. Kas kasılması ile A bandı ve I bantları merkeze doğru çekilir. I bantlarının boyu kısalmaya başlarken A bandının boyu ise değişmez. I bantları merkeze doğru hareket ederken beraberinde Z bantlarını da çeker ve sarkomerin boyu kısalmaya başlar (Şekil 2.3) (Chen vd 2018).



Şekil 2.3 İskelet kasının gevşek ve kasılı olduğu durumda sarkomerin yapısı (Lodish vd 2000)

2.1.1.6. İskelet kas proteinlerinin moleküler yapısı

Miyozin; Her bir miyozin molekülü 2 ağır zincir (ağır meromyozin), 4 hafif zincir (hafif meromyozin) ve 2 globüler baştan oluşur. Ağır meromyozin iki zincirin spiral olarak sarılmasıyla oluşur ve her bir zincir miyozinin globüler baş kısmını oluşturur (Zhang vd 2016). Globüler baş, miyozin ATPaz enzimi aktivitesi ile ATP'yi yıkarak kasılma için enerjiyi elde eden bir katalitik bölgeye ve kasılma esnasında aktin üzerine bağlanan bölgeye sahiptir (Şekil 2.4). Baş kısmı hareketli olup, kontraksiyon boyunca aktin filamentlerini bağlar. Bağlanmayı takiben miyozinin, aktin filamentlerini sarkomerin merkezine doğru çekmesiyle (güç vurumu) kas kısalır ve kas gücünün oluşması sağlanır. Miyozin ve aktinin aktif kenetlenmesine "kayan filamentler teorisi" adı verilir (Huxley ve Hanson 1954)



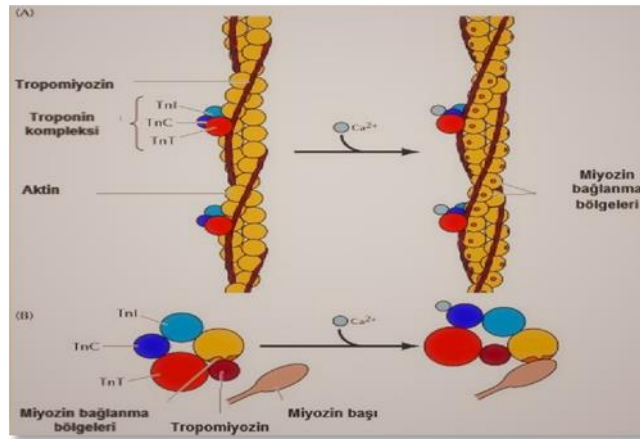
Şekil 2.4 Miyozin filament yapısı (Walsh 2011)

Aktin; Heliks şeklinde polimerize olan bir mikrofilamenttir. Aktin iki ayrı biçimde bulunur: Globüler monomerik formu G-aktin ve polimer formu F-aktindir. Aktin molekülleri 375 amino asitlik (43 kDa) globüler (G) proteindir ve yüzeyinde adenosin difosfat (ADP) molekülü tutunmuştur. G proteinleri ATP'nin hidrolize olması ile F-aktin formuna polimerize olurlar (Sweeney ve Houdusse 2010). İki polipeptid yapıdan oluşan F-aktin dizisi sarmal yaparlar. Sarmal yapan zincirlerin üzerinde miyozin başının

bağlanması için zikzak olarak yerleşmiş aktif bölgeler bulunur. Aynı zamanda F-aktin yüzeyinde tropomiyozin ve troponin proteinleri yer alır (Şekil 2.5) (Dominguez ve Holmes 2011).

Tropomiyozin; Aktin çift sarmalında her kol için bir tropomiyozin bulunur. İnce heliks yapısında bir protein olan tropomiyozin, F-aktin sarmalının kenarlarında spiral olarak bulunur (White vd 1992). Her bir tropomiyozin, dinlenme durumunda aktif aktinin 7 bağlanma bölgesini kapatır. Böylece miyozinin aktine bağlanmasını engeller (Şekil 2.5).

Troponin; Troponin kompleksinin troponin C (TnnC) 18,000 Da; troponin I (TnnI) 21,000 Da; troponin T (TnnT) 37,000 Da olmak üzere farklı moleküler ağırlıklara sahip üç farklı proteini vardır (Şekil 2.5) (Giannoni vd 2009): TnnC, Ca^{+2} u bağlar. Bağlanmayı takiben tropomiyozin molekülünün şeklini değiştirerek aktinin miyozin bağlanma bölgelerini açığa çıkarır ve kas kasılmasını aktive eder. TnnT tropomiyozine bağlanarak troponin-tropomiyozin kompleksini oluşturur ve kasın kasılması ile dayanıklılığını düzenler. Üç tip TnnT bulunur; yavaş (TnnT1), kardiyak (TnnT2), ve hızlı (TnnT3) (Gomes vd 2004, Brotto 2005). TnnT1 ve TnnT3 iskelet kasında bulunur. TnnI, kardiyak, hızlı ve yavaş olmak üzere üç izoforma sahiptir (Schilder vd 2011). TnnI1 yavaş kasılan kas, TnnI2 hızlı kasılan kas ve TnnI3 kardiyak troponin I olmak üzere üç homolog gene sahiptir. TnnI1 ve TnnI2 erişkin iskelet kaslarında bulunur (Sheng ve Jin 2016).

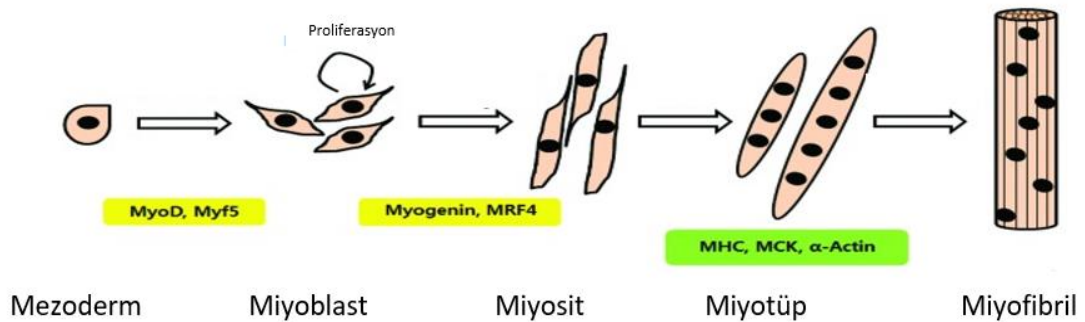


Şekil 2.5 Aktin, troponin ve tropomiyozin moleküllerinin yapısı (Copper 2000)

İskelet kasında kontraktıl proteinlerin yanında yapısal proteinler de vardır. Bunlar α -aktin, nebulin, titin, obskurin gibi proteinler olup aşağıda açıklanmıştır;

α -aktin; α -aktin sarkomerik ince filamentin esas yapısını oluşturur ve Z diski ile de etkileşim halindedir. α -aktin kas kasılmasında temel rol oynar ve kas kasılması sırasında yeterli gücü oluşturmak için kalın filament miyozinle bağlanmaya aracılık eder (Donkervoot vd 2017). α -aktini kodlayan *ACTA1* geninde oluşan mutasyon sonucunda,

G-aktinin F-aktine polimerizasyonunda, aktin filamentlerinin kayma hızında, Ca^{+2} regülasyonunda veya α -aktinine bağlanma gücünde değişiklikler oluşur. Yapılan çalışmalarda *ACTA1* geninde saptanan mutasyonların miyopatiler ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Clarke vd 2007, Feng ve Marston 2009). Miyofibrilogenезis sürecinde de *ACTA1*'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Guo vd 2016). Erken farklılaşma evresinde miyoblastlar tek çekirdekli miyositlere, sonraki geç farklılaşma evresinde füzyon ile çok çekirdekli miyotüplere farklılaşırlar. Çok çekirdekli miyotüpler miyozin ağır zincir, CK ve α -aktin gibi kasın yapısal proteinlerini eksprese ederler (You-Na ve Eun-Joo 2013).



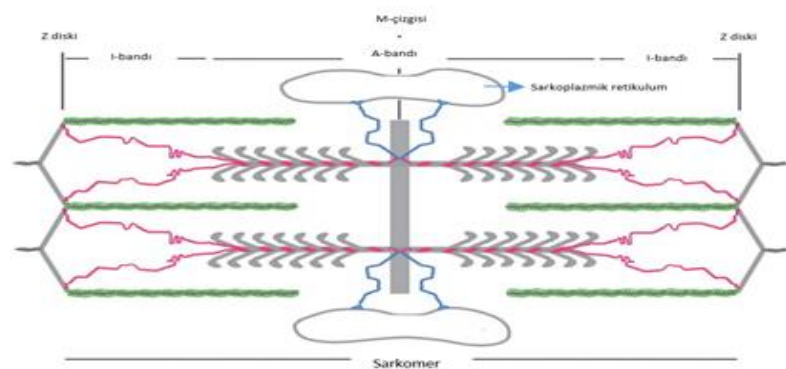
Şekil 2.6 α -aktin'in miyojenik farklılaşmada rolü (You-Na ve Eun-Joo 2013)

Nebulin; ~600–900 kDa ağırlığa sahip bir protein olan nebulinin keşfi için büyüklüğünden dolayı megadaltonları ayrıştıran küçük gözenekli jellere ihtiyaç duyulmuştur (Wang ve Williamson 1980). İlk keşfedildiğinde fonksiyonları tanımlanamadığından adına nebulin denilmiştir (Jin ve Wang 1991). Yapılan ilk çalışmalarda, nebulinin polipeptit formunda filament benzeri bir yapı olduğu ve bu yapının aktin filamentleri ile aynı alanda lokalize olduğu gösterilmiştir (Yu vd 2003). Devam eden çalışmalarda nebulinin Z-diski ile aktin filamentine yüksek afinitede bağlandığı, aktin filamentine paralel seyrettiği (Pappas vd 2008) ve aktini Z-diskine bağladığı gösterilmiştir (Şekil 2.7). Nebulin aktin filamentlerinin uzunluklarının belirlenmesi, kas kasılmasının düzenlenmesi, Z bantlarının oluşumu, ve miyofibril organizasyonunu da içeren bir grup hücresel olayda rol oynar (Chu vd 2016). Nebulin SH3 domaini içerir ve kendi fonksiyonlarına ek olarak Z bandına birden fazla protein ile bağlanır. Bağlanan proteinler sırasıyla; α -aktinin içeren aktin hücre iskeleti, myopalladin ile ubiquitin eksprese eden homoloğu palladin, Ena/VASP ve sistin proteini zengin (CSR) aile üyeleri ve zyxin'dir (Bang vd 2001, Ma ve Wang 2002, Li vd 2004, Chitose vd 2010).

Titin; Sarkomerin yarısını oluşturan büyük ve elastik yapıda sarkomerik protein olan titin (~3.7 MDa), vücuttaki en büyük proteinlerden biri olup Z-diskinin majör yapısal proteindir (Luther ve Squire 2002). Titin çizgili kas sarkomerinde Z-çizgisini M-

çizgisine bağlar (Şekil 2.7). Nebulinin SH3 domaini, biri Z diskinde diğeri I bandında lokalize olmak üzere titinle iki alanda bağlanır (Ma ve Wang 2002, Ma vd 2006, Witt vd 2006). Bununla birlikte nebulin ve titin arasındaki etkileşimin işlevi henüz net olarak bilinmemektedir. Titin iskelet kasının elastik özelliklerinin sağlanmasında görevli olduğu düşünülen Z-çizgisi bağlayıcı proteindir (Pellegrino vd 2016). Böylece miyozin filamentlerinin stabilize olmasını sağlar. Titin filamentöz yapıda olduğu için çok esnektir. Bu özellik sarkomere esneklik kazandırır. Aktin ve miyozin için hücre iskeleti görevi görerek bir arada tutar. α -aktinin ve titin proteinlerinin ileri sürülen özellikleri mekanik gerilimde düzenleyici proteinlerin birbiri ile etkileşimini, kas gen ekspresyonu ile kontrol etmeleridir (Clark vd 2002).

Obskurin; Büyük bir miyofibriler protein olup, birkaç yapıyla etkileşim modülüne sahiptir Bunlardan biri, kasa-özgül ankrin molekülüne ve titine bağlanmaya aracılık etmesidir (Young vd 2001,). M-bandının yapısına katılır ve titin, miyomesin proteinleriyle etkileşim halindedir (Şekil 2.7) (Kontrogianni-Konstantopoulos vd 2009). Sarkomerik proteinlere ek olarak, obskurin ankrin proteinlerinin birkaç izoformuyla etkileşime girer (Bagnato vd 2003, Kontrogianni-Konstantopoulos vd 2003, Armani vd 2006, Borzok vd 2007, Cunha ve Mohler 2008). Ankrinler adaptör proteinlerdir. İntegral membran proteinleri ile spektrin temelli hücre iskeleti arasında köprü görevi görür ve plazma membranının spesifik bölgelerinde protein komplekslerinin bağlanmasını sağlar (Bennett ve Baines 2001, Bennett ve Healy 2009). Obskurin ile kasa-özgül ankrin *sAnk1.5* arasındaki etkileşim iskelet kasında sarkoplazmik retikulum organizasyonunu düzenler. İskelet kasının kasılmasında da önemli rol oynar (Carlsson vd 2008). Erişkin iskelet kaslarında dominant izoform obskurin A olup, bu molekülün hücre dışı sinyali kinaz fosforilasyon yönleri ile regüle eden 420 aminoasitten oluşan alanları bulunur (Young vd 2001). Obskurin, miyofibrilleri geliştirmekte olan iskelet ve kalp kasında M-bandı düzeyinde çevreler. İskelet kası nöromusküler bağlantılarının postsinaptik bölgedeki önemli bir komponenti olup, erişkin kalpte bulunmaz (Randazzo vd 2017).

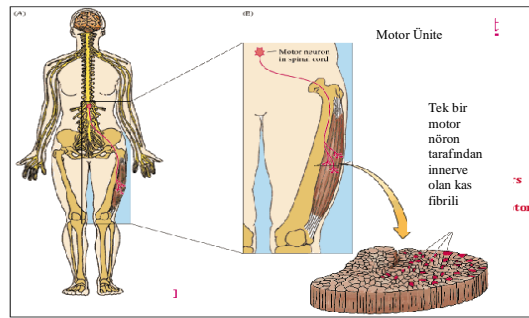


Şekil 2.7 İskelet kası proteinleri (Meyer ve Wright 2013) Nebulin (yeşil), obskurin (mavi) ve titinin (kırmızı) sarkomer içindeki yerleşimini göstermektedir.

2.1.1.7. İskelet kası kasılması

2.1.1.7.1. Uyarılma-kasılma eşleşmesi

Uyarılma-kasılma eşleşmesi terimi 1952 yılında elektriksel uyarının mekanik cevaba dönüşümünü açıklamak için kullanılmıştır. Serebral korteksten çıkan uyarılar, hücre gövdeleri medulla spinalisin ventral boynuzunda yer alan α -motor nöronlar ile iskelet kasını innerve ederler. Ventral kökten çıkan motor nöron aksonları periferik sinirlerle kaslara ulaşır. Bir motor nöron ve bu nöronla uyarılan kas liflerinin tümüne “motor ünite” adı verilir (Şekil 2.8). Motor nöronun uyarılmasına bağlı olarak bir motor ünitenin innerve ettiği tüm kas liflerinde kasılma eş zamanlı olarak meydana gelir (Heckman ve Enoka 2012). Motor nöronların aksonları ve iskelet kas lifleri arasında yer alan kavşaklara sinir-kas kavşağı veya motor son plak adı verilir. Bir motor sinir, sinir-kas kavşağına yaklaşırken miyelin kılıfını kaybeder ve çok ince dallara ayrılır. Aksonun uç dalları asetilkolin (Ach) vezikülleri taşır (Lebrasseur vd 2003).

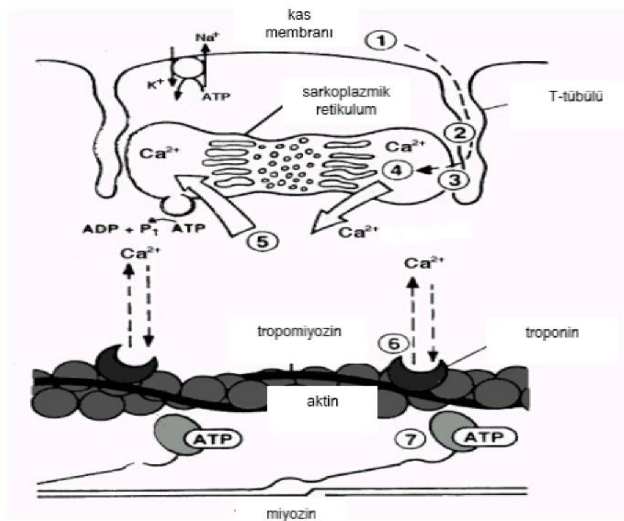


Şekil 2.8 Motor ünite (Lichtman vd 1987)

Motor korteksin uyarılması sonucunda motor nöron boyunca akson ucuna kadar aksiyon potansiyeli iletilir ve akson ucunun depolarize olmasıyla voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları açılır, İntertisyel sıvıdaki Ca^{+2} kendi elektrokimyasal gradiyenti doğrultusunda akson ucuna akar (Martin vd 2012). Ca^{+2} artması ile Ach vezikülleri plazma zarı ile birleşir ve Ach ekzositozla sinaps aralığına salınır. Ach sinir-kas kavşağına bırakılınca, sarkolemma üzerindeki motor son plakta bulunan Ach reseptörüne bağlanır (Kaminski vd 2004). Bu bağlanma sırasıyla Na^{+} ve K^{+} geçirgenliğini artırır. Na^{+} iyonlarının kas lifi içine akışı ile depolarizasyon gerçekleşir. Kasın depolarize olması ile aksiyon potansiyeli fibril membranından başlar ve T-tübülleri boyunca fibril içlerine doğru ilerler. T-tübülleri boyunca yayılan aksiyon potansiyeli sarkoplazmik retikulumda bulunan iyon kanallarını açar ve sarkoplazmaya Ca^{+2} iyonunu salar (Takekura vd 2003).

T-tübüllerinde lokalize olan L-tipi Ca^{+2} kanallarına voltaj duyarlı dihidropiridin reseptörü (DHPR), sarkoplazmik retikulumda bulunan Ca^{+2} serbestleyen kanallara ise ryanodin reseptörleri (RyR) adı da verilir (Beam ve Bannister 2010). DHPR'ler RyR 'lere bağlıdır. DHPR depolarizasyon ile aktive olduğunda L-tipi Ca^{+2} kanallarının

konformasyonel olarak değişime uğraması ile hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artar (Golini vd 2011). Serbestlenen Ca^{+2} aktin filamentinin troponin C'sine bağlanır ve bu bağlanmayı takiben çapraz-köprü döngüsü başlar (Rebbeck vd 2014). Motor nöron aktivitesi sonlandığında DHPR dinlenme durumundaki yapısına döner ve RyR kapanır. Ca^{+2} ATPaz (SERCA) ile uzaklaştırılan Ca^{+2} Troponin C'den ayrıldığı için çapraz köprü döngüsü durur (Fan vd 2004). Ca^{+2} 'un hücre membranı aracılığıyla hücre dışına uzaklaştırılması büyük ölçüde Na^{+} - Ca^{+2} değiştiricisi tarafından sağlanmaktadır. Na^{+} - Ca^{+2} değiştiricisi elektrojeniktir ve bu sebeple fonksiyonu, membran potansiyelinden önemli düzeyde etkilenmektedir (Rebbeck vd 2014). Na^{+} - Ca^{+2} değiştiricisinin aktivitesi Na^{+} ve Ca^{+2} 'un hücre içi konsantrasyon değerleri tarafından düzenlenmektedir. Na^{+} - Ca^{+2} değiştiricisi hücre içinden Ca^{+2} 'u uzaklaştırırken, intraselüler ortamdaki Na^{+} konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır (Wada vd 2013). Bu duruma karşılık hücre içi Na^{+} konsantrasyonu, Na^{+} - K^{+} ATPaz tarafından Na^{+} 'un aktif olarak uzaklaştırılması ile korunmaktadır (Li vd 2019) (şekil 2.9).

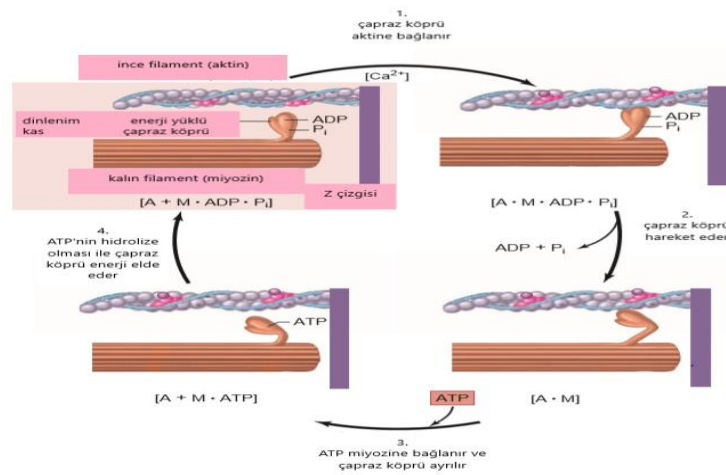


şekil 2.9 Uyarılma-kasılma eşleşmesi (Lamb 2000)

2.1.1.7.2. Kasılma mekanizması (çapraz köprü döngüsü)

Kayan filamentler teorisi 1954 yılında iki birbirinden bağımsız grup tarafından, ATP hidrolizi ile aktin ve miyozin filamentlerinin birbiri üzerinde kaymalarının kas kasılması ile sonuçlandığını göstermeleri ile ortaya konmuştur (Huxley ve Hanson 1954). Bu teori günümüze kadar bir çok kez modifiye edilse de artık genel bir kas kasılma modeli olarak kabul görmüştür (Geeves vd 2005). Çapraz köprü döngüsünde kasılma, miyozin başının aktin bağlanma bölgelerine bağlanması ve sarkomerin merkezine doğru ilerlemesi ile gerçekleşir. Bu olaya "çapraz köprü döngüsü" adı verilir (Günther vd 2018). Ca^{+2} Troponin C'ye bağlanır ve tropomiyozin aktin bağlanma alanlarını açığa

çıkartır. Aktinin bağlanma bölgesi açığa çıkınca, güç vurumu öncesi miyozin başı nükelotid bağlama özelliği ile ATP varlığında gevşek olarak aktine bağlanır. Miyozin boynu ATP'nin hidrolizi ile hareket eder (Sweeney ve Houdusse 2004). Önce miyozin başı, ATP'yi, ADP ve inorganik fosfata (Pi) ayırır böylece miyozin başı güç vurumu öncesi pozisyona hazırlanır. Aktin-miyozin-ADP-Pi kompleksi oluşur ve miyozin başları 90 derecelik açı ile bağlanır. Miyozin başı aktine bağlanınca ATP'den bir Pi salınır ve miyozin başında konformasyonel değişiklik gerçekleşir (Geeves vd 2005). Miyozin başının boyunla yaptığı açı 90 dereceden 50 dereceye düşer ve aktine güç vurumu uygular (Fitts 2008). Böylece, aktin ve miyozin filamentleri birbiri üzerinden kayarlar. Güç vurumunun bitimini takiben ADP miyozin başından salınır, buna rigor evresi adı verilir. Miyozin başından ADP ayrılınca açı 45 dereceye düşer ve kayma işlemi sonlanır (Şekil 2.10). Aktinden ayrılan miyozin başı yeni bir ATP'ye bağlanınca rigor durumu sona erer ve miyozin başında yeni bir güç vurumuna hazırlık için şekil değişikliği gerçekleşir. Tüm bu döngü aktin filamentleri boyunca aynı şekilde devam eder. Kas gevşeme döneminde aktin ve miyozin arasındaki etkileşim, düzenleyici proteinler olan tropomiyozin-troponin kompleksinin aktinin miyozin bağlanma bölgelerini bloke etmesiyle sona erer. Bu döngü Ca^{2+} ve ATP var olduğu sürece tekrar eder.



Şekil 2.10 Çapraz köprü döngüsü (Widmair vd 2014)

2.1.1.8. İskelet kas lifi tipleri

Kas lifleri kasılma hızı ve metabolik özelliklerine dayandırılarak Tip I (kırmızı lifler) ve Tip II (beyaz lifler) şeklinde sınıflandırılmıştır (Ciciliot vd 2013). Kırmızı lifler daha fazla kapiller içerir, daha yüksek konsantrasyonda miyogloblin ve daha büyük mitokondriye sahiptir; esas olarak aerobik solunum yoluyla ATP üretirler. Bahsedilen özellikleri sebebiyle Tip I lifleri yorgunluğa karşı dayanıklıdır. Hücresel çapları küçüktür. Tip I liflerde miyozin başı-ATPaz oranları nispeten azdır, bu da yavaş tempoda kasılma

döngüsüyle sonuçlanır (Clarke 2011). Bu liflere oksidatif kapasiteleri yüksek olduğu için yavaş oksidatif lifler adı da verilir. Postüre katkı sağlarlar. Soleus gibi postür ile ilgili kaslarda fibril tip I oranı daha yüksek bulunur (Serrano vd 2008).

Tip II lifleri daha az kapiller içerir ve beyaz fibriller adını da alırlar. Bununla birlikte, miyogloblin içeriği, mitokondri yoğunluğu ve oksidatif enzimleri daha azdır (Larsson vd 1993). Anaerobik kapasiteleri Tip I liflere oranla daha yüksektir. Fosfofruktokinaz, fosforilaz, laktat dehidrogenaz gibi glikolitik enzimleri daha fazladır (Ciciliot vd 2013). Bu nedenle tip II fibriller ATP yenilenmesinde anaerobik süreçleri daha fazla kullanırlar. Anaerobik enerji kaynağı sınırlıdır ve çabuk tükenir. Çabuk tükenme özelliklerinden dolayı bu fibriller sürat ve kuvvet aktiviteleri ile ilgilidirler (Schiaffino ve Reggiani 2011). Tip IIa ve Tip IIb olmak üzere 2'ye ayrılırlar .

Hızlı oksidatif glikolitik lifler (Tip IIa), çap olarak biraz daha büyük olmaları ve yüksek hücre içi glikojen içeriğine sahip olmaları haricinde, tip I lifleri ile benzer özelliklere sahiptir. Kırmızı renkli olup, anaerobik glikoliz yoluyla ATP üretirler. Miyozin başları ATP'yi tip I fibrillere kıyasla daha büyük bir oranda hidrolize eden ATPaz'a sahiptir (Bottinelli vd 1994). Hızlı glikolitik lifler (tip IIx/b) beyaz renklidir. Hücre içi glikojen düzeyleri yüksektir. Temel olarak glikoliz yoluyla ATP oluştururlar, miyogloblin içerikleri düşük olup, az sayıda mitokondriye sahiptirler (Capitanio vd 2006). Bu özellikleri yüksek anaerobik kapasiteye sahip olmalarına yol açar. Çabuk yorulurlar. Güçlü kasılmalar sağlayan çok sayıda miyofibril içerirler. En büyük çapa sahip olup, hızlı kasılırlar (Tablo 2.1) (Bottinelli vd 1994). Postürel kaslar yavaş lifler açısından zengin olup, hızlı ve etkili hareketlerde görev yapan kasların büyük bir kısmı hızlı kasılan liflerden oluşur (Ciciliot vd 2013).

Tablo 2.1 İskelet kasındaki farklı lif tiplerinin yapısal, metabolik ve işlevsel karşılaştırılması

Özellik	Yavaş lifler	Hızlı lifler	
	Tip I	Tip IIx/b	Tip IIa
Mitokondri sayısı	Yüksek	Düşük	Yüksek
Baskın metabolik yol	Aerobik	Anaerobik	Anaerobik/Aerobik
Yorgunluğa direnç	Yüksek	Düşük	Yüksek/Orta
ATPaz etkinliği	Düşük	Yüksek	Yüksek
Kasılma hızı	Yavaş	Yüksek	Yüksek
Kuvvet üretimi	Orta	Yüksek	Yüksek

2.2. KAS HASAR VE ONARIMI

İskelet kası, yeniden şekillenme (remodeling), onarım ve rejenerasyon kapasitesi yüksek dinamik bir dokudur (Boppart vd 2015). Normal şartlar altında yetişkin iskelet kası stabil olup ancak gündelik yıpranmaların baskısı altında çok düşük oranda

yenilenme gösterir (Beiner ve Jokl 2001, Counsel ve Breidahl 2010). Akut iskelet kası hasarları genellikle aşırı fiziksel aktiviteye bağlı olarak gelişmektedir (Bes ve Hunter 2000, Huard vd 2002). Kas hasarının somut belirtisi sarkomer yapısının bozulmasıdır (Mchugh vd 1998).

Kas hasar ve onarımı kompleks süreçler olup, bu süreçlerde basamaklar halinde dejenerasyon, inflamasyon, rejenerasyon ve fibrozis olayları gerçekleşir (Burd ve De Lisio 2017). İskelet kası hasar sırasında oluşan değişimlere adapte olabilecek dinamik kapasiteye sahiptir. Hasarı takiben ilk olarak gerçekleşen dejenerasyon ve eşlik eden infalamasyon fazı kas hasarını takiben ilk birkaç günde gerçekleşir. Kaslarda dejenerasyon, hasarlı kas fibrillerinin nekrozisi ile başlar. Nekrozun nedeni, sarkolemanın çözünmeye başlaması ve kas lifinin permeabilitesinin artmış olmasıdır. Sonuç olarak, hücre içi kas proteinleri hücre dışı ortama salınabilir (Beiner ve Jokl 2001). Öte yandan, bazı hücre dışı maddeler kas liflerine difüze olabilirler. Kas lifi nekrozu sırasında geçirgenlik artışına bağlı hücre içinde aşırı Ca^{+2} birikimi görülür. Ca^{+2} miktarındaki artış, Ca^{+2} bağımlı proteazları aktive eder ve kas yıkımı yönünde etki eder (Counsel ve Breidahl 2010). Kas lifi nekrozu ayrıca kompleman kaskadlarının aktivasyonu ile inflamatuvar cevabın başlamasına da neden olur. Nötrofiller ve makrofajlar nekrotik dokuya göç eder.

Hasardan yaklaşık 6 saat sonra nötrofiller lokal inflamasyon alanına ulaşırlar. Nötrofillerin reaktif oksijen türleri (ROS) üretmek için güçlü bir kapasiteye sahip oldukları iyi bilinmektedir. Büyük miktardaki serbest oksijen radikalleri yapımının amacı yabancı mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasıdır (Fielding vd 1993). Göç eden ilk makrofajlar pro-inflamatuvar sitokinler salgılamak suretiyle hücre debrislerinin fagositozundan sorumludurlar. Daha sonra göç eden makrofajlar ise anti-inflamatuvar sitokinler salgılar ve inflamasyon bitene kadar hasarlı bölgede kalırlar. Inflamasyonu rejeneratif cevap izler. Kas rejenerasyonunda temel olarak iki farklı makrofaj işlev görür. M1 makrofajları inflamasyonu arttırmak için pro inflamatuvar sitokinler sekrete ederken, M2 makrofajları ise CD68-/CD163+ yüzey belirteci ile karakterize olup, inflamasyon sona erene kadar anti inflamatuvar sitokinler sekrete ederler (Cantini vd 2002, Sonnet vd 2006). Hasarlı bölgeye göç eden makrofajlar lokal fibroblastlarla beraber ortama çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler salgırlar.

Kas hasarını takiben genel olarak ilk 1 haftada rejenerasyon süreci başlar, 2. haftada pik yapar ve 3-4. haftada azalır. Ortama salınan sinyal molekülleri uydu hücrelerinin aktivasyon, proliferasyon ve göç etmesine neden olur. Rejenerasyonun ilk basamağı sessiz halde bulunan kas uydu hücrelerinin aktivasyonudur. FGF-2, HGF, IGF-1, IL-6, EGF, insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2), TGF- β , lösemi inhibe edici faktör (LIF), trombosit-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), tümör nekroze edici faktör-alfa

(TNF- α)'yı içeren büyüme faktörleri gibi çok sayıda intrensek ve ekstrensek faktör uydu hücre aktivasyonuna aracılık eder (Hawke ve Garry 2001, Macaluso ve Myburgh 2012). Aktive olan uydu hücreleri asimetrik olarak bölünerek miyoblastlara proliferer olurlar, bir kısmı kök hücre özelliklerini koruyarak nişlerinde kalırken diğerleri proliferasyona devam eder. Miyoblast proliferasyonu IGF-1, IL-6, TGF- β 'yı da içeren ekstraselüler sinyaller aracılığıyla gerçekleştirilir (Charge ve Rudnicki 2004). Gelişen miyoblast, kas çekirdeğinin rutin onarımı için bir kas lifiyle füzyona uğrayabildiği gibi, sporadik bir hasar veya immobilizasyona bağlı gelişmiş çekirdek kaybının yerine konmasına da yol açabilir (O'Reilly vd 2008).

Kas rejenerasyonunun son basamağı miyoblastların birbirleri ile füzyona uğramasıyla yeni kas liflerinin oluşmasıdır. Miyoblastların bazıları füzyona uğramaz, tekrar uydu hücre nişine katılır. Kas lifi tamamen nekroza uğramış olduğunda, geride kalan bazal lamina iskele olarak kullanılır (Baoge vd 2012). Yeni oluşmuş kas liflerinin iki önemli göstergesi çekirdeklerin hücre merkezinde yerleşmiş olmaları ve kas liflerinde embriyonik miyozin ağır zincir protein varlığıdır. Rejenerasyon başında bu yeni kas lifleri protein sentezi ve embriyonik miyozin ağır zincir ifadelerinden dolayı bazofiliktir. Rejenere kas lifleri diğerlerine göre küçük olarak izlenir (McCarthy vd 2011). Yeni oluşan kas lifleri hücre içi kontraktıl eleman ifadelerini arttırarak olgunlaşmaya başlarlar. Bu şekilde merkezi yerleşimli çekirdek zamanla kas lifi periferine göç eder (Yin vd 2013). Erişkin kas rejenerasyonu çok basamaklı bir süreç olup çok çekirdekli erişkin miyofibril gelişimi ile sonlanır (McCarthy vd 2011, Bellamy vd 2014). Kas fibril rejenerasyonu sırasında kas hasarından sonraki ikinci ve üçüncü hafta arasında, tip I ve tip III kollajen sentezlenmesi sonucunda fibrozis oluşabilir (Huard vd 2002).

2.2.1. Kas hasar belirteçleri

Kas membranının bozulması sonucunda dolaşıma karışan bazı kasa ait enzimler kas hasar varlığı ve derecesini gösteren biyokimyasal belirteçler olarak kabul edilirler. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.

Kreatin kinaz (CK);

CK iki subüniteye sahip dominant bir enzimdir ve her bir ünitesi 43–45 kDa olan dimerik globüler proteindir. CK, kreatinin fosfokreatine ve ADP'nin ATP'ye geri dönüşümlü fosforilasyonunu katalize eder ve hücresel ATP'nin rejenerasyonunda önem arz eder. Böylece kasın ATP düzeyini sabit tutar (Brancaccio vd 2007). CK çizgili kas (CK-MM), kalp kası (CK-MB) ve beyinde (CK-BB) bulunur. Özellikle iskelet kasında çok aktiftir. 5 izoformu vardır; üç izoenzimi sitoplazmada (CK-MM, CK-MB, CK-BB) ve iki izoenzimi

(non-sarkomerik ve sarkomerik) mitokondride bulunur. İskelet kasındaki CK aktivitesinin %99'unu CK-MM izoenzimi oluşturur (Schneider vd 1995). Hasara bağlı doku harabiyetinde sitoplazmik izoenzimler (CK-MM, CK-MB, CK-BB) spesifik bilgi verirler. Kompleks bir yapıya sahip olup en az 28 farklı protein içerir. CK-MM miyofibrillerde ATP tüketiminin olduğu çeşitli domainlerde bulunur ve önemli kas hasarı belirteçidir (Hornemann vd 2000). Direnç egzersizlerinde sarkolemma ve Z-disklerinde yapısal bozulmalar ile iskelet kas hasarı gelişir ve toplam plazma CK düzeyi artar (Epstein 1995).

Kreatin fosfat+ADP<----->Kreatin+ATP (Lohmann reaksiyonu)

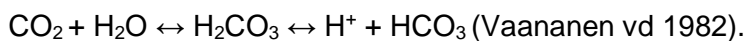
Kreatin kinaz

TnnI;

Tnnt ve TnnI hasar belirteci olarak görev alırlar. Kronik kas hasarı olan hastalarda Tnnt konsantrasyonu artar. Kardiyak TnnI ise miyokardiyal hasarı belirlemek için ölçülür (Collinson 1998). İskelet kası TnnI kas fibriline spesifik olup iskelet kası hasarı için duyarlı bir belirteçtir (Sorichter vd 1997). Plazma membranında, miyofilamentlerde ve ara filamentlerde mekanik hasara bağlı olarak gelişen kas fibril nekrozu sonucunda plazmada TnnI artar. İskelet kasına spesifik troponini belirlemek amacıyla geliştirilen tahlil yöntemleri, farklı troponin izoformları ile hasarın sadece kökeni hakkında bilgi vermekle kalmaz; aynı zamanda türünü belirlerlemeye de yardımcı olur (Onuoha vd 2001). Egzersizin türüne bağlı olarak egzersiz ile gelişen hasarlarda TnnI'nin arttığı gösterilmiştir (Chapman vd 2013).

Karbonik anhidraz 3 (CA3);

Karbonik anhidrazlar bakır (Cu⁺²) içeren metalloproteaz enzimler olup, farklı izoformları mevcuttur. CA 1, 2, 3, 7, and 13 sitozolik, CA 4, 9, 12, 14, ve 15 membran bağımlı, CAs 5A ve 5B mitokondriyal ve CA 6 tükürük ve sütte bulunan izoformlardır (Karhumaa vd 2001). CA karbondioksit (CO₂) hidrasyonunu geri dönüşümlü olarak katalize eder ve tamponlama sisteminde görev alır:



CA3, tip 1 iskelet kaslarında ekprese edilir ve iskelet kas hasarının önemli bir belirteci olarak kabul edilir (Fu vd 2009). Egzersizi takiben ve nöromüsküler hastalıklarda CA III'ün serum konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (Lippi vd 2008). CA3 eksikliğinde gastrocnemius kasının mitokondriyal ATP sentezinde bozulmalar gözlemlenir. Klinikte kas hastalığı için tanısal belirteç olarak kullanımı vardır. CK ve aldolaz'dan daha fazla hassasiyetle tip I lif anormalliklerini yansıtır. CA3 konsantrasyonlarındaki artış ve azalışlar CK, AST ve LDH'tan daha hızlıdır (Beuerle vd

2000). Bu özelliklerinin yanında son yıllarda erken kas gelişiminde mezodermal belirteç olarak da görev aldığı gösterilmiştir (Zhang vd 2018).

2.3. EGZERSİZ

Egzersiz fiziksel iyilik halinin sağlanabilmesi için gerçekleştirilen tekrarlı, planlanmış ve yapılandırılmış fiziksel aktiviteler olarak tanımlanabilir (Armstrong vd 2006). Düzenli yapılan egzersizin, insan sağlığı açısından pekçok olumlu etkisi bilinmektedir (Adamu vd 2006, Prasad ve Das 2009).

Egzersiz tipleri, kullanılan enerji kaynaklarına göre genel olarak aerobik ve anaerobik olarak iki sınıfa ayrılabilir. Bazı spor dallarında enerji kaynaklarından biri diğerine oranla daha baskın kullanılırken, bazılarında ise hem aerobik hem de anaerobik enerji sistemlerinin katkısı önemli düzeydedir (Wilmore ve Costill 2001). Vücudun egzersize fizyolojik cevabı da egzersiz tipine göre değişiklikler göstermektedir. Anaerobik enerji üretimi egzersiz süresi kısaldıkça, yoğunluğu arttıkça artarken; egzersiz süresi uzayıp, yoğunluğu azaldıkça aerobik enerji üretimi artar. Yürüme, jogging, koşma, yüzme, paten, bisiklet, kürek, kayak, aerobik egzersizlerdir. Aerobik egzersiz aynı zamanda endurans (dayanıklılık) egzersizi olarak da bilinmekte olup, uzun süre iş yapabilme ve eforu devam ettirebilme yeteneği olarak tanımlanmıştır. Aerobik kapasite oksijen sistemi ve kardiyorespiratuvar sistem kapasitesinin göstergesi olup, VO_{2max} ile değerlendirilmektedir (Kalyon 2000).

Direnç egzersizleri (izometrik egzersiz, Anaerobik egzersiz), hücrenin enerji ihtiyacını oksijenden bağımsız olarak sağladığı kısa süreli ve yüksek şiddetli çalışmalardır. Tenis, ağırlık kaldırma, kısa süreli hızlı koşular, futbol, basketbol, hentbol, sprint ve zıplama gibi aktivitelerde anaerobik süreçler hakimdir (Egan ve Zierath 2013). Amerikan Spor Tıp Koleji (ACSM) direnç antrenmanını; kas kuvvetini ve kas dayanıklılığını arttırmaya yönelik alıştırmalardan oluşan özel bir çalışma şekli olarak tanımlamıştır (Armstrong vd 2006). Direnç egzersizleriyle oluşan fizyolojik ve biyokimyasal cevaplar, endurans egzersizlerinden farklıdır. VO_{2max} 'ın ağır dirençli eğitimden önemli oranda etkilenmediği düşünülmektedir (Çubukcu vd 2007).

İskelet kası sarkomerlerinin kısılması, kuvvetin kaslardan vücudun kaldıraç sistemine aktarılması için şarttır. Tekrarlayan kas kasılmaları dayanıklılığın artmasına yol açan uzun süreli adaptasyonları uyarır (Boppart vd 2013, Kraemer ve Castracane 2015). Egzersizin sarkomer miyofibril içeriği, sarkomer sayısı ve dolayısıyla kas gücünde artışa sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca, fiziksel aktivite, kas hipertrofisi/kuvveti/yorulmaya karşı direnci artırarak kas atrofisine karşı koruma

sağlayabilir (McPhee vd 2016). Egzersiz iskelet kasında, kontraktıl protein izoformlarında, protein turnover'ında, mitokondriyal fonksiyonlar, hücre içi sinyaller veya transkripsiyonel cevapta oluşturduğu değişikliklerle çeşitli adaptasyonlara neden olabilir (Şekil 2.11) (Smiles vd 2016, Goodpaster ve Sparks 2017).

EGZERSİZ	
Aerobik	Anaerobik
Mitokondriyal biyogeneziste artış	Anabolik ve antikatabolik etki
Kapiller kan akımında artış	Hızlı kasılan fibrillerde hipertrofi
Kasın oksidatif kapasitesinde artış	Miyofibriler proteinlerde daha hızlı yenilenme
Sarkomerik proteinlerde daha hızlı yenilenme	Hızlı kasılan fibrillerde kalitatif yeniden şekillenme
Tip I ve tip IIA fibrillerinde kalitatif yeniden şekillenme	Kasılma kuvvet kapasitesinde artış
Endurans kapasitesinde artış	

Şekil 2.11 İki temel egzersiz tipinin iskelet kasına etkisi

2.3.1. Yüzme Egzersizi

Yüzme egzersizi, su içerisinde gerçekleştirilen anlamlı hareketler bütünüdür (Hanula 2001) ve hayvanlar için doğal bir davranış modelidir (Arshadi vd 2015). Tüm vücut kaslarının kullanıldığı bu fiziksel aktivitenin kaslarda kuvvet kazanımı üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Suyun içinde yatay olarak yapılır ve böylece sürtünme kuvveti en aza indirilir veya yok edilir. Bu egzersiz tipi minimal düzeyde mekanik stress oluşturmakta ve bu özellikleriyle tercih edilebilmektedir (Grasii vd 1992). Hastalar tarafından eksantrik tipteki egzersizlere göre daha kolay tolere edilebilen bir egzersiz türü olmasından dolayı, hastalıkların tedavisinde sıklıkla önerilen fiziksel aktivitelerdendir (Tanaka 2009). Eklemlere binen yük miktarı da azaldığı için pek çok kronik hastalık tedavisinde güvenli bir egzersiz tipidir (Lazar vd 2013).

2.3.2. Egzersize bağlı kas hasarı ve onarım süreçleri

Egzersiz tip, şiddet, sıklık ve süresine bağlı olarak kas hasarı ve ardından miyofibril yeniden şekillenmesine yol açabilir. Fiziksel aktivite doku yeniden şekillenmesinin güçlü

bir uyararı, sağlığın korunmasının önemli bir bileşeni olarak ele alınmakta olup, bu konudaki çalışmalar hızla artmaktadır. Birbiri içine geçmiş, karmaşık fizyolojik/biyokimyasal/moleküler kas hasar ve onarım mekanizmaları güncel literatür bilgisi kapsamında aşağıda tartışılmıştır.

İskelet kası tamiri; etkin yeniden şekillenme (remodeling), doku bütünlüğünün idamesi ve egzersizi takiben gelişen adaptasyon süreci için şarttır (Boppart vd 2013, Boppart vd 2015). Egzersizi takiben miyofibrillerin hasar ve yeniden şekillenmesi basamakları için ileri sürülen mekanizmaya göre; egzersize bağlı kas hasarı sarkomerde α -aktinin, titin ve nebulin proteinlerinin kaybına neden olur. Bu durum, sitoplazmik havuzlarda G-aktin işlevi ve aktin filamentlerinin fokal büyümesini kolaylaştırabilir. Aktin filamentlerinin uzaması yeni sarkomer oluşumu ve α -aktinin, titin ve nebulin proteinlerinin reintegrasyonuna yol açar. Aktin ve desmin filamentleri olasılıkla bu yeniden oluşum için mekanik ve yapısal bir çatı oluşturmakta, α -aktinin ve titin ve daha sonra da nebulin bu sarkomerik oluşuma katılmaktadır.

Yukarıda açıklanan mekanizmalara ek olarak, literatürde titinin egzersize bağlı iskelet kas hasarı ve yeniden şekillenmesinde birbirinden farklı, çok sayıda görevleri olabileceği ileri sürülmektedir (Krüger ve Kötter 2016). Bunlar aşağıda özetlenmiştir;

1. Egzersiz ile tetiklenen doku hasarına cevap olarak titin olasılıkla sarkomerdeki yerinden ayrılır, parçalanır ve adaptif hipertrofik sinyallerde önemli basamaklara aracılık eder.
2. Sarkomerde yerinde kalan titin filamentleri post translasyonel değişikliklerle güçlenerek sarkomer stabilitesi, bütünlüğü ve egzersiz kaynaklı kuvvet artışına katkıda bulunur.
3. Titin proteininin posttranslasyonel modifikasyonları muhtemelen titinin sertliği ve dolayısıyla mekanik kas kasılması performansını etkiler. Sıçanlarda tek seferde 15 dakika süreyle uygulanan eksantrik egzersizin titinin PEVK-domaininin fosforilasyonu sonucu m. vastus lateraliste titin esaslı sertleşmeye neden olduğu ileri sürülmüştür (Müller vd 2014). Ca^{+2} titinin PEVK elementi ile ilişkilidir (Labeit vd 2003). Titin sertleşmesi egzersiz süresince sarkomerin bütünlüğünü korur ve kasılma-gevşeme döngüsünün etkinliğini artırır.
4. Sarkomer hasarı titini de içeren proteinlerin kalpain aracılı degradasyonunu başlatır. Aynı zamanda sarkomerogenezis ve fibril onarımını destekleyen titin ile ilgili hipertrofik cevaba aracılık eder. Tekrarlayan egzersizler sonucu bu hipertrofik cevap artar ve adaptif kas yeniden şekillenmesi gelişir. Yeniden şekillenme titin, desmin, distrofini de içeren yapısal proteinlerin gen ekspresyonlarındaki artış ile ilişkilidir (Teran-Garcia vd 2005, Bellafiore vd 2007, Lehti vd 2007).

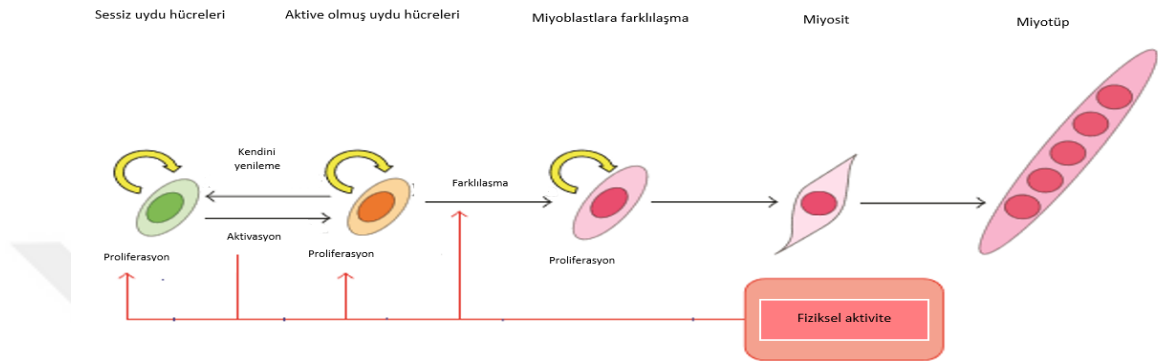
Yukarıdaki mekanizmalara ek olarak, farklı egzersiz türlerinin ROS oluşumu yoluyla oksidatif strese ve cevaben de antioksidan savunma sistemi aktivasyonuna sebep olabildiği literatürde ayrıntılı olarak incelenmiştir (Harju vd 2013). Öte yandan, egzersiz sırasında ROS aşırı üretiminin antioksidan savunmayı engelleyerek hemeostazisin bozulmasına neden olabildiği de ileri sürülmüştür. Bu durum, hücrel lipit, protein ve nükleik asitlerin etkilenmesi yoluyla farklı düzeyde hücrel hasara neden olabilir (Sen 1992). Fiziksel aktivite sırasında, ROS temel kaynağının aktif kas mitokondrieleri olduğu ileri sürülmektedir. Düzenli uygulanan aerobik antrenman egzersizin neden olduğu stresin büyüklüğünü ve böylece egzersiz sırasında meydana gelen hücrel hasarı azaltabilir (Margaritis vd 1997).

Mitokondrieler oksidatif fosforilasyon yoluyla gerekli enerjinin yaklaşık % 90'ını ATP şeklinde üretmeleri sebebiyle "hücresin güç merkezi" olarak adlandırılırlar. Mitokondriyal solunum zinciri 5 adet multi subüniteli enzim komplekslerini içeren bir diziyeye (kompleks I, II, III, IV ve V) ve iki elektron taşıyıcıya (ubikinon ve cyc) sahiptir. Bu iki elektron taşıyıcısı, elektron taşıma zincirindeki (ETS) elektronların etkin transferinde kritik rol oynamaktadır (Kushnareva vd 2002, Koopman vd 2007). Sitokrom c (cyc) küçük (moleküler ağırlığı: ~ 12,500 Da, 104 aminoasit), suda çözünebilir aktif bir metalloprotein olup mitokondri iç membranında yerleşmiştir (Martinou vd 2000). Yüksek oranda korunmuş üç boyutlu (3D) bir yapıya sahiptir ve kovalent olarak aktif hem prostetik grubuna eklenmiştir (Harju vd 2013). Kritik elektron transfer proteini olarak tanımlanmış olan cyc ve mitokondriyal ETS'nin bir parçası olarak elektron transferine katılan enerji üretim sürecinin vazgeçilmez bir parçasıdır (Leanne vd 2003, Luo vd 2008). Enerji üretiminde mitokondriyal solunum zincirinde, kompleks III ve kompleks IV (cyc oksidaz)'lerin membranında elektron taşıyıcı olarak fonksiyon görür. Mitokondriyal elektron transfer reaksiyonu sırasında, cyc indirgenmiş demir (Fe^{+2}) ve oksitlenmiş demir (Fe^{+3}) arasındaki elektron değişiminde görev alır (Wang vd 2002).

Cyc çok fonksiyonlu bir enzim olup, hücrenin hem yaşam hem de ölüm kararını belirler (Raisanen vd 1999). Mitokondriden cyc salınımı apoptozom oluşumu ve hücre ölümü süreçlerinin ilerlemesi için önemli bir adımdır (Hüttemann vd 2011). Bu yönüyle, salınan cyc miktarı mitokondriyal disfonksiyon ve hücrel apoptozun önemli göstergelerinden biri olarak ele alınabilir (Wang 2001). ROS üretimi yüksek olduğunda, mitokondriden cyc salınımı meydana gelir. Kısa süreli fiziksel egzersiz ile serbest bırakılan cyc'nin, sitozolik faktörlerle etkileşime girerek apoptozom oluşturduğu gösterilmiştir (Kowaltowski vd 2001, Yuan vd 2013).

Hem kimyasal hem de egzersiz/aşırı yüklenme ile oluşan kas hasarına yanıt olarak ortaya çıkan kas rejenerasyonunda uydu hücrelerin rolü ortaya konmuştur (Şekil 2.12). Egzersizi takiben kaslarda oluşan mikro hasarlar gibi değişimlere cevaben,

sessiz halde duran uydu hücreler aktive olurlar. İskelet kasları, daha fazla kas kaybını önlemek için (Shi ve Garry 2006), rejenerasyon kapasitesi yüksek olan uydu hücre havuzunda devamlı olarak uydu hücrelerini aktive ederler. Kas aktivitesi uydu hücrelerin proliferasyonunu artırırken, kasların inaktif olması ise satelit hücrelerin proliferasyonunu azaltır (Bazgir ve Asgari 2015). Uygulanan egzersizin şiddeti, yoğunluğu, süresi ve tipi bunlara ek olarak cinsiyet, yaş ve antrenman düzeyi uydu hücre aktivasyonunu etkiler (Bazgir vd 2017).



Şekil 2.12 Fiziksel aktiviteye yanıt olarak uydu aktivasyon proliferasyon ve farklılaşması (Bazgir vd 2017)

Egzersize cevaben ortaya çıkan kas rejenerasyonunda MSC kök hücrelerin indirekt olarak rol oynuyor olabileceği konusundaki ön veriler, dikkatlerin egzersizle MSC hücre grupları arasındaki ilişkiye yönlendirilmesine yol açmıştır. Literatürde eksantrik tipteki egzersizleri takiben MSC kök hücrelerin kas tamirine katkısını inceleyen az sayıda, fakat önemli veriler sunan çalışma mevcuttur. Bahsedilen araştırmaların önemli bir kısmı farelerde gerçekleştirildiği için mevcut tezde de verilerin karşılaştırılabilir olması sebebiyle deney hayvanı olarak fare tercih edilmiştir. Valero ve arkadaşları, tek seferlik akut eksantrik egzersizi takiben (20° eğim, 17 m/dk, 30 dk) MSC kök hücre oranını akım sitometri ile incelemiş ve egzersizden 24 saat sonra kas örneklerinde MSC kök hücre sayısında iki katlık artış tespit etmişlerdir (Valero vd 2012). Kas kaynaklı MSC'lerin (1×10^4) yukarıda özellikleri verilen egzersiz protokolünü takiben 1 saat içinde alıcı kasına nakli, uydu hücre sayısı ve yeni lif sentezinde artışa yol açmıştır (Valero vd 2012). Transplantasyonun erişkin farede, tekrarlayan eksantrik egzersiz seanslarını (haftada 3 kez, 4 hafta) takiben miyonükleer toplanma, kas lifi büyümesi ve kas kuvvetinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Zou vd 2015). MSC'lerin direk olarak yeni lif sayısında artışa yol açmadığı gözlenmiş; bu hücrelerin kas tamirini lokal faktörler salgılamak suretiyle gerçekleştirebildikleri, bu faktörlerin de uydu hücre uyarımına yol açabileceği ileri sürülmüştür (Valero vd 2012, Huntsman vd 2013, De Lisio vd 2014). Literatürdeki konu ile ilgili çalışmalarda ağırlıklı olarak akut

egzersizin etkileri incelenmiştir (Cramer vd 2004, Bellamy vd 2014, Nederveen vd 2015). Hyldahl ve arkadaşları insanlarda uyguladıkları tek bir eksantrik egzersiz seansını takiben erken yanıtı (3 saat) incelemiş ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) transkripsiyon faktörünün eksantrik egzersize yanıt olarak etkilenen anahtar moleküler eleman olduğunu ortaya koymuşlardır (Hyldahl vd 2011). Araştırmacılar egzersizi takiben NF-κB DNA bağlanma aktivitesinde 1.6 katlık artış tespit etmişlerdir. İmmünohistokimyasal kolokalizasyon analizleri NF-κB-pozitif çekirdeklerin çoğunun perisitlerde lokalize olduğunu göstermiştir. Öte yandan, egzersizden 3 saat sonra alınan kas örneklerinde uydu hücre sayısında bir artış tespit edilmemiştir. Bu verinin uydu hücrelerin eksantrik egzersize yanıt olarak ortaya çıkan rejeneratif yanıtı katılmadıkları şeklinde yorumlanmasından ziyade, 3 saatlik sürenin uydu hücre aktivasyonu için yeterli olmadığı şeklinde yorumlanmasının daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır (Hyldahl vd 2011). Bu sav, benzer bir diz ekstansiyon protokolünü takiben Pax7⁺ uydu hücrelerin 24, 72, 120 saat gibi geç zaman dilimlerinde arttığının, ancak 4 saat sonra yüksek bulunmadığının gösterilmesiyle desteklenmiştir (McKay vd 2009). Olasılıkla egzersize erken yanıtta perisit uyarımı ve perisit NF-κB aktivitesi artışı meydana gelirken, ileri dönemde uydu hücre aktivasyonu ve dolayısıyla kas rejenerasyonu gerçekleşmektedir. Hyldahl ve arkadaşlarının mikroarray verileri ve takiben yaptıkları kantitatif reverse transkriptaz PCR (qRT-PCR) sonuçları IL-6, VEGF gibi NF-κB yolağı aktivasyonuna bağlı ekspresyonları artan ve TGF-β gibi NF-κB kompleksi aktivasyonunda rol alan sitokinlerin miktarlarındaki katlı artışları (fold change) ortaya koymuştur (Hyldahl vd 2011). Öte yandan, akut direnç ve dayanıklılık egzersizlerine yanıt olarak NF-κB aktivasyonunu inceleyen çalışmalardan biri artış bildirirken (Tantiwong vd 2010), diğeri fark gözlenmediğini ortaya koymuştur (Durham vd 2004). Sonuçlar arasındaki uyumsuzluk, egzersize yanıt olarak gözlenen kas hasar/rejenerasyon mekanizmalarının ortaya çıkarılmasında; uygulanan egzersiz türüne ek olarak örnek toplanma zamanının da önemine işaret etmektedir. Egzersiz ve kas rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda genellikle eksantrik egzersiz protokolleri uygulanmıştır (Farup vd 2014, Imaoka vd 2015).

Dickinson ve arkadaşları ise yakın zamanda (Dickinson vd 2018) 6 sağlıklı aktif genç erkekte bir seferlik direnç egzersizinin egzersizi takiben erken dönemde alınan vastus lateralis kas örneklerinde PI3K/Akt yolağıyla ilişkisini göstermiş ve farklı egzersiz türlerinin (aerobik-direnç) iskelet kasında farklı moleküler aktiviteleri uyardığını ileri sürmüşlerdir. Günümüzde akut egzersiz veya antrenmanı takiben kas hasar ve rejenerasyonuna aracılık eden yanıtlar, yolaklar ve bunların birbirleri ile etkileşimi henüz net olarak ortaya çıkarılmamıştır. Yüzme egzersizi hayvanlar için doğal bir davranış modeli olup (Arshadi vd 2015), pek çok kişiye rahatlıkla önerilebilecek,

hastalar tarafından da eksantrik tipteki egzersizlere göre daha kolay tolere edilebilen bir egzersiz türü olması sebebiyle seçilmiştir. Farklı tip ve sürelerle (akut-kronik) uygulanan yüzme egzersizlerini takiben zamana bağlı kas hasar ve rejenerasyonu ile bu süreçlerde rol oynayan yolları ve birbirleriyle etkileşimlerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yukarıda tanımlanan bilgi eksikliklerinin bir kısmını giderebilmek amacıyla mevcut doktora tezi kapsamında; akut ve kronik yüzme egzersizlerini takiben kas hasarı ve kas rejenerasyonunun iki farklı zaman diliminde (3 ve 24 saat) belirlenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak, Whole-transkriptom analizi ve takiben ekspresyon değişimlerinin verifikasyonu yapılarak yüzme egzersiziyle uyarılan kas hasarı/yeni kas lifi oluşumu süreciyle eş zamanlı ifadeleri değişen hedef sinyal iletim yolları çizilmiştir. Mevcut çalışma, bahsedilen olası yollar ve bunların birbirleriyle etkileşiminin ortaya çıkarılmasının, iskelet kası iyileşmesinin hız ve etkinliğini arttırmaya yönelik farmakolojik olmayan, minimal düzeyde yan etkiye sahip yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine yol açabileceği ön görülerek planlanmıştır.

2.2. Hipotez

Yukarıdaki bilgiler ışığında doktora tezimin hipotezleri şu şekilde sıralanabilir;

- 1) Yüzme egzersizi kas hasar ve rejenerasyonuna sebep olur.
- 2) Yüzme egzersizini takiben ortaya çıkan kas hasarı ve miyogenezde henüz tanımlanmamış sinyal iletim yolları görev alır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

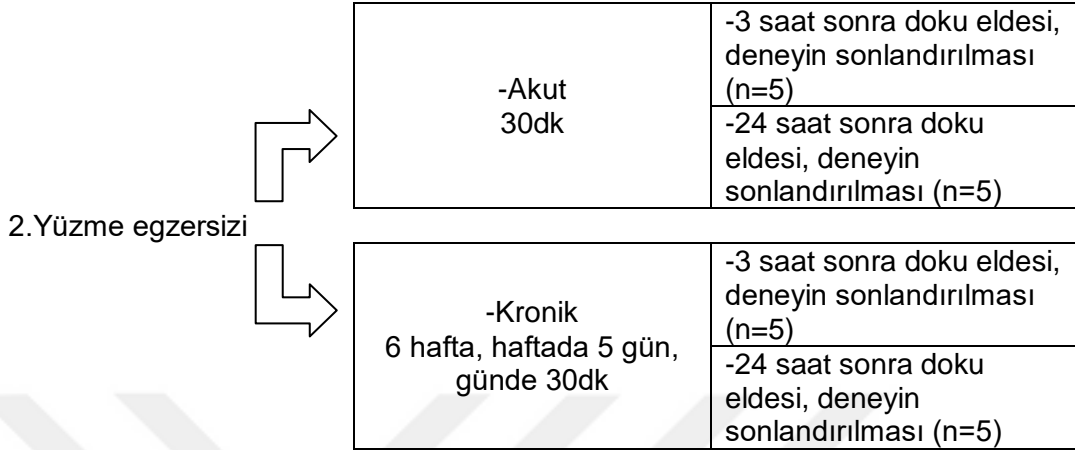
Çalışma kapsamında hayvanların temini, bakımı, egzersiz programlarının uygulanması ve örnek alma aşamaları için Pamukkale Üniversitesi (PAÜ) Deney Hayvanları Araştırma birimi (DEHAB) kullanılmıştır. Alınacak kan örneklerinden CK aktivitesi ölçümü, Gastrocnemius-soleus kas kompleksi diseksiyonu PAÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu dokulardan kas rejenerasyonu değerlendirilmesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı; Whole-transkriptom analizi ve analiz sonrası sonuçların verifikasyonu PAÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın tüm aşamaları PAÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (PAÜHADYEK) yönetmeliğine uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya PAÜHADYEK tarafından onay verilmiştir (PAUHADYEK-2017/17).

3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması

Deneyle 8-12 haftalık 25 erişkin erkek fareler kullanılmıştır. Hayvanlar çalışma süresince standart şartlar altında havalandırılmalı, sabit ısı odalarda, % 50 ± 5 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan laboratuvar koşullarında barındırılarak, özel hazırlanmış kafeslerde tutulmuş; veteriner hekim kontrolü altında bakılmıştır. Fareler enfeksiyon yönünden çok sıkı (gün aşırı) veteriner hekim eşliğinde kontrol edilmiştir. Farelerin beslenmesinde 8 mm'lik standart fare pellet yemi kullanılmıştır. İçme suyu olarak musluk suyu verilmiştir. Hayvanların istedikleri kadar yem ve su tüketmelerine izin verilmiştir. Deney grupları aşağıdaki şekilde planlanmıştır (Şekil 3.1); Fareler kontrol grubu ve yüzme egzersizi grubu olarak 2'ye ayrılmıştır. Sedanter gruptakilerin kafeslerinde serbestçe dolaşmalarına izin verilmiş, ancak her gün handling uygulanmıştır. Egzersiz grupları kendi içlerinde akut ve kronik egzersiz olarak 2'ye bölündükten sonra her biri egzersizi takiben deneyin sonlandırılmasına kadar geçecek zaman açısından (3 saat, 24 saat) tekrar 2'ye ayrılmıştır. Böylece toplam 5 deney grubu oluşturulmuştur. Akut yüzme egzersizi 30 dk ve tek seans olarak; uzun süreli yüzme egzersizi ise 6 hafta/haftada 5 gün 30 dk; olacak şekilde uygulanmıştır. Fareler DEHAB'dan aralıklı olarak elde edilerek egzersiz programına

alınmıştır. Böylece egzersiz uygulama yaşının tüm hayvanlar için aynı olması sağlanmıştır.

1.Kontrol (n=5)



Şekil 3.1 Deney gruplarının şematik gösterimi

3.2. Yüzme Egzersizi

Yüzme egzersizleri DEHAB'da bulunan su tankında su ısısı $32 \pm 3^\circ\text{C}$ 'da sabit tutularak uygulanmıştır. Bu tank; 44 cm en, 68 cm boy ve 34 cm yüksekliğindedir. Akut yüzme egzersizi 30 dk ve tek seans olarak; uzun süreli yüzme egzersizi 6 hafta/haftada 5 gün 30 dk uygulanmıştır. Farelerin yüzmeye alıştırılması amacıyla, 1. gün 10 dakika ile başlanmış, her gün süresi orantılı olarak arttırılarak 3. gün 30 dk'ya çıkmıştır. Her yüzme egzersizi uygulamasından sonra fareler havlu ile kurulmuş, sonra kafeslerine alınmıştır (Scomparin vd 2011).

3.3. Deneyin Sonlandırılması, Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Fareler Ketamin-HCl/Xylazine-HCl (75mg/kg-10 mg/kg) anestezisi altında kalpten steril heparinli enjektörle kan almak suretiyle kansızlaştırılarak öldürülmüştür. Deney böylece sonlandırılmıştır. Gastrocnemius-soleus kasları diseke edilmiş, bir kısmı histolojik incelemeler için ayrılmış, diğerleri Tıbbi Genetik AD'nca kullanılmıştır. Doku örnekleri hızlıca sıvı azot tankında dondurularak, daha sonra analiz edilmek üzere -80°C 'de saklanmıştır. Kan örnekleri aynı gün santrifüj edilerek (5000g, 5 dk), plazmalar plazma CK aktivitesi ölçümü için -80°C 'de saklanmıştır.

3.4. Histolojik İncelemeler İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku takibi, bloklama ve boyama işlemleri uygulanmıştır. Dokular ilk olarak formaldehitte bekletilmiştir (Formaldehit koruyucu sıvı CH₂O) (%10'luk formol). Takiben dehidratasyon işlemi uygulanmıştır. Dehidratasyon için sırasıyla %70, %80, 90, 95 ve 100'lük etil alkolde dokular 1'er saat bekletilmiştir. Takiben ksilen'de 1 saat bekletilerek şeffaflaştırma ve parafin'de 1 saat (60 °C) bloklama, mikrotomda kesit alma ve lama aktarma işlemleri uygulanmıştır (Kesim öncesinde +4 °C'de saklanmıştır. Kesim anında dokuya ve bloğun durumuna göre buz üstünde kesimler yapılmıştır). Deparafinizasyon işlemi için lamlar 58-60 °C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. Kesitlerin lama yapıştırılması ve parafinin dokudan uzaklaştırılmaya başlanması sağlanmıştır. Ksilol'de 5 dakika bekletilerek fazla parafinin uzaklaştırılması ve sertleştirilmesi sağlanmıştır. Ardından sırasıyla, %100, %95 ve %70'lik alkolde 5'er dakika bekletilmiştir. Bu hidratasyon işleminin amacı Ksilen'in giderilmesidir. Doku kesitleri distile suda 10 dakika bekletilerek kaybettikleri su tekrar kazandırılmış ve böylece deparafizasyon işlemi sonlandırılmıştır.

Hematoksilen-Eozin ile boyama işlemi için sırasıyla şu işlemler uygulanmıştır;

- Hematoksilen'de 4-5 dakika bekletilmiştir
- Çeşmede akan suda 2 dakika yıkama yapılmıştır
- Asit-alkol çözeltilisinden (%80'lik alkolde %1'lik HCl çözeltisi) 10 saniye geçirilmiştir

Diferansiyasyon, fazla boyanın uzaklaştırılması işlemidir.

- Çeşme de akan suda 1 dakika yıkama yapılmıştır (diferansiyasyonun durdurulması).
- Amonyaklı suda 10 saniye bekletilmiştir (%1 Amonyaklı çözelti, bazik ortamda mavileşmenin sağlanması).
- Çeşmede akan suda 1.5 dakika yıkama yapılmıştır.
- Eozin'de 1 dakika bekletilmiştir.
- Çeşmede akan suda 30 saniye yıkama yapılmıştır.

Kapatma işlemi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır;

- %70'lik alkolde 1-2 dakika bekletilmiştir.
- %95'lik alkolde 1-2 dakika bekletilmiştir
- %100'lük alkolde 10 dakika bekletilmiştir.

Kurutma işlemi için; Ksilol'de 5-10 dakika bekletilmiştir (Havalandırılmalı kapaklı kabinde 5 dakika kadar kurutuldu). Kapatma (Montaj) işlemi uygulanmıştır: Doku üzerine 1 damla entellan damlatılmıştır. Entellan doku üzerinde ince bir tabaka olacak şekilde lamelle kapatılmıştır. Hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilmiştir ve kurumaya bırakılmıştır.

3.5. Kas Hasarının Histolojik Olarak Belirlenmesi

Kas hasarı; kas hasar yüzdesi, histolojik hasar skorlaması (H-skoru) ve lökosit infiltrasyonu belirlenerek değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sırasında kas lifleri arası açılmalar, liflerin bütünlüğünün kaybolması ve Z bantlarındaki dalgalanmalar incelenmiştir. Parafin bloklardan alınan her kesitte 1000 adet kas lifi yukarıdaki kriterlere göre teker teker sayılmıştır. 1000 lifte bulunan hasarlı ve hasarlı olmayan miyositler belirlenmiştir. Hasarlı miyositler tüm miyositlere oranlanmış ve kas hasarı yüzdesi aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir (Hori vd 2013);

$$(\text{Hasarlı miyositler/toplam miyositler}) \times 100 = \text{Hasar yüzdesi}$$

Histolojik hasar skorlaması (H-skoru) aşağıdaki şekilde belirlenmiştir;

H-skoru (0=normal, 1=hafif, 2=orta, 3= şiddetli) (Erkanli vd 2005).

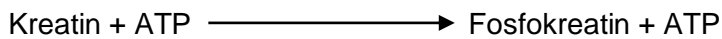
Lökosit infiltrasyonu belirlenmesi için her preparatta lökosit sayımı yapıp 0-25 arası lökosit sayısı 0=normal olarak kabul edilmiştir. Preparat başına 25-50 arası lökosit sayıları 1=hafif, 50-75 arası 2=orta, 75-100 arası lökosit sayıları 3= şiddetli olarak skorlanmıştır.

3.6. Histolojik Olarak Kas Rejenerasyonu Değerlendirilmesi;

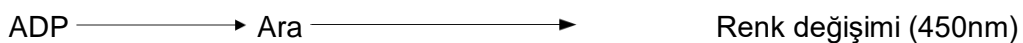
Yeni oluşan kas liflerinin boyut olarak küçük ve çekirdeklerinin merkezi yerleşimli olduğu bilinmektedir (McCarthy 2011). Hematoksilen eozin ile boyanma sonrası kas lifi boyutları ve merkezi yerleşimli çekirdekler histolojik olarak belirlenmiştir.

3.7. Plazma CK Aktivitesi Ölçümü

Creatine Kinase Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Sengle vd 2015). Kit aşağıdaki prensibe göre çalışmaktadır;



CK enzim CK geliştirici



Standartlar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

Standart numarası	NADH standart hacim (µl)	CK assay buffer (µl)	Kuyucuklarda son konsantrasyon değeri (nmol/well))
1	0	150	0
2	6	144	2
3	12	138	4
4	18	132	6
5	24	126	8
6	30	120	10

Okumalar duplike yapılmış, ΔOD_{450} belirlenmiş ve aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır;

Tek bir örnek için hesaplama ;

$$(\text{Örnek}_2 - \text{Örnek}_{2 \text{ BG}}) - (\text{Örnek}_1 - \text{Örnek}_{1 \text{ BG}}) = \Delta OD_{450}$$

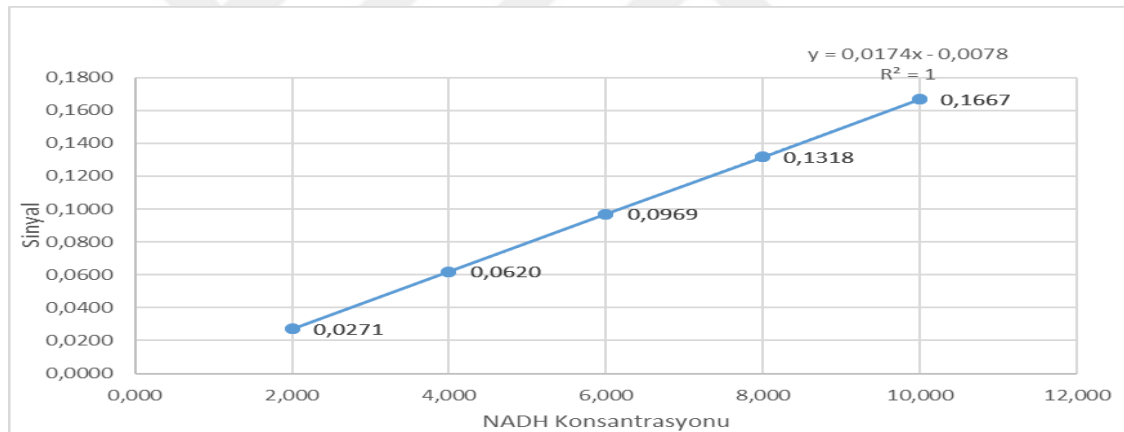
Örnek₁ = T1 süresinde okunan örnek

Örnek_{1 BG} = T1 süresinde okunan arka plan kontrol örnek

Örnek₂ = T2 süresinde okunan örnek

Örnek_{2 BG} = T2 süresinde okunan arka plan kontrol örnek

Elde edilen standart grafiği aşağıdaki şekildedir;



y (absorbans) = NADH konsantrasyonu = $0,0174x$ (konsantrasyon değeri) – $0,0078$

$(\text{NADH konsantrasyonu} / \Delta T \times V) \times \text{dilüsyon faktörü} = \text{CK aktivitesi (nmol/min/mL veya mU/mL)}$

ΔT = ölçümler arası süre

V = kuyucuklara eklenen örneklerin miktarı (µl)

3.8. Total RNA İzolasyonu;

RNA later stabilizasyon solüsyonu (AM7020, Ambion) içinde saklanan m. Gastrocnemius ve soleus doku örneklerinden total RNA izolasyonu ticari kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen) yardımı ile yapılmıştır. Kitin çalışma prensibi, aşağıdaki basamakları içerir;

- Denatüre edici koşullarda, doku lizis tamponu ve proteinaz K uygulaması ile örnekteki hücrelerin parçalanması sağlanmıştır.
- Etanol yardımı ile izolasyon kolonunun membranına, parçalanmış hücrelerden açığa çıkan RNA'nın bağlanması sağlanmıştır.
- Yıkama tamponları ile önceki basamaklardan arta kalan hücre artıkları ve kimyasallar uzaklaştırıldıktan sonra total RNA, RNaz içermeyen tamponla yeni bir tüpe alınmıştır.

İzole edilen total RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle (NanoDrop 2000C, Thermo Sci.) belirlenmiştir.

3.9. Whole-Transkriptom Analizi;

İzole edilen total RNA örneklerinden, gen ekspresyon analizleri Whole-transkriptom fare mikroarray chipleri (Affymetrix GeneChip® Mouse Gene ST Arrays, Affymetric Inc.) ve bu transkriptom analizine özgün protokol kullanılarak belirlenmiştir. Bu protokolle analiz edilecek total referans transcript sayısı 35.240 olarak tanımlanmıştır (Bu transkriptlerden 26.191'ini kodlama yapan transkriptler oluşturmaktadır).

Whole-transkriptom analiz protokolünün basamakları:

1.gün

I. Total RNA örneklerinin Poly-A ile işaretlenmesi

İlk basamakta uygulanan bu aşama, mikroarray'in ekzojen pozitif kontrolünü amaçlamaktadır. Dolayısıyla çalışma sonunda örneklerden sinyal alınamadığında, örnek kaynaklı problemlerin olduğunu yorumlayabilmek amacı ile uygulanmaktadır.

A. Total RNA örneklerini hazırlanma

- İzole edilen total RNA örnekleri, toplamda 50 ng konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen su yardımı ile 3 µl hacime ayarlanmıştır (Reaksiyona girebilecek en yüksek hacim 3 µl olarak belirtilmiştir).

B. Poly-A RNA kontrolleri hazırlama (GeneChip mikroarray'lerin hibridizasyon yoğunluklarını denetlenmek amacıyla kitle birlikte sağlanan kontrol RNA örnekleri, çalışma örnekleri ile birlikte işaretlenmiştir)

- Mikroarray analizi için kitle birlikte sağlanan Poly-A kontrol stoğu (901864) ve Poly-A kontrol dilüsyon tamponu (901863) kullanılarak 4 seri dilüsyon hazırlanmıştır. Özetle;

Poly-A kontrol stoktan 2 µl alınmış ve üzerine 38 µl Poly A kontrol dilüsyon tamponu eklenerek 1/20 dilüsyonda karışım elde edilmiştir. Bu karışımdan 2 µl alınmış ve üzerine 98 µl Poly-A kontrol dilüsyonu eklenerek 1/50 dilüsyonda karışım elde edilmiştir. Yine bu karışımdan 2 µl alınmış ve 98 µl Poly-A kontrol dilüsyon tamponu eklenerek 1/50 dilüsyonda karışım elde edilmiştir. Son olarak yine bir önceki basamakta oluşan karışımdan 10 µl alınmış ve üzerine 180 µl Poly-A kontrol dilüsyon tamponu eklenerek 1/20 dilüsyonda karışım elde edilmiştir. Böylece, Poly-A kontrol stoğu sırasıyla 20 kat, 50 kat, 50 kat ve 20 kat dilüe edilmiştir.

C. İşaretleme

- A maddesinde belirtildiği şekli ile hazırlanan total RNA örneklerinin üzerine, B maddesinde belirtildiği şekilde hazırlanan son konsantrasyondaki karışımdan 2 µl eklenmiş ve vorteks yardımı ile homojenize edilmiştir.

II. Tek iplik (ss) cDNA sentezi

Kitle birlikte sağlanan tek iplik enzimi (901898) ve tamponu (901892) kullanılarak, bir önceki aşamada hazırlanan örneklerden tek iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

- Örnek başına 1 µl tek iplik enzimi ve 4 µl tek iplik tamponu eklenerek yeni bir karışım hazırlanmış ve homojenize edilmiştir. Örnekler 25°C'de 60 dk, 42°C'de 60 dk ve 4°C'de 2 dk'lık tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiş ve sonrasında tek iplik cDNA sentezini gerçekleştirilmiştir.

III. Çift iplik (ds) cDNA sentezi

Kitle birlikte sağlanan çift iplik enzimi (901900) ve tamponu (901899) kullanılarak, bir önceki aşamada hazırlanan örneklerden çift iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

- Bir önceki aşamada elde edilen her bir örneğe 2 µl çift iplik enzimi ve 18 µl çift iplik tamponu eklenerek yeni bir karışım hazırlanmış ve homojenize edilmiştir. Örnekler 16°C'de 60 dk, 65°C'de 10 dk ve 4°C'de 2 dk'lık tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiş ve sonrasında çift iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

IV. In vitro transkripsiyon ile cRNA sentezi

Kitle birlikte sağlanan in vitro transkripsiyon enzimi (901901) ve tamponu (902098) kullanılarak, bir önceki aşamada hazırlanan örneklerden cRNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

- Bir önceki aşamada elde edilen her bir örneğe 6 µl in vitro transkripsiyon enzimi ve 24 µl in vitro transkripsiyon tamponu eklenerek yeni bir karışım hazırlanmış ve homojenize edilmiştir. Örnekler 40°C'de 16 saat inkübasyonu içeren tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiş ve sonrasında çift iplik cDNA örneğinden cRNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

2.gün

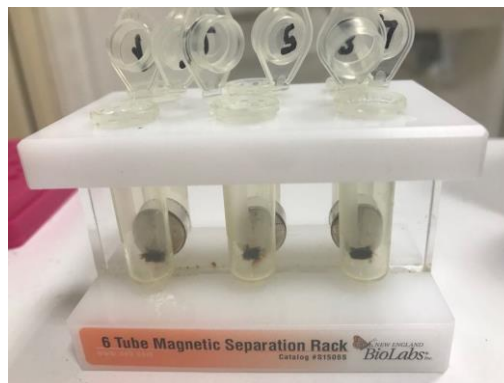
V. cRNA pürifikasyonu

Kitle birlikte sağlanan magnetik boncuklar (901893) kullanılarak, bir önceki aşamada elde edilen cRNA örneklerinin pürifikasyon aşaması tamamlandı.

- Bir önceki aşamadan elde edilen örnekler 16 saat sonunda buz üstüne alınmış ve her bir örnekten 2 µl alınarak, steril ependorf tüpüne aktarılmıştır.

- Örneklerin üzerine, kitle birlikte sağlanan pürifikasyon boncuklarından 100 µl eklenmiş ve 10 dk inkübasyona bırakılmıştır (Pürifikasyon boncuklarının dibe çökmemesi için her kullanımda iyice homojenize olması sağlanmıştır. Kullanılan bu magnetik boncuklar, elde edilen RNA'lara bağlanarak RNA'ların pürifiye edilmelerini sağlamaktadır).

- İnkübasyon sonrası örnekler, manyetik standı (Magnetic Separation Rack, BioLabs) yerleştirilmiş ve ependorf tüplerindeki sıvı tamamen şeffaf olana kadar (yaklaşık 5 dk) inkübe edilmiştir (Şekil 3.2) (RNA'ya bağlı halde bulunan magnetik boncuklar, manyetik standın yüzeyinde bulunan mıknatıs yardımı ile RNA örneklerinin ependorf tüpü içinde kalmasını sağlamaktadır).



Şekil 3.2 Magnetik Seperasyon Rack'ı kullanılarak, magnetik pürifikasyon boncukları yardımı ile RNA örneklerinin ependorf tüplerindeki görünümü

- İnkübasyon sonrası, ependorf tüpleri içinde kalan berrak sıvı mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve her bir örneğe 200 µl %80'lik etanol (Merck) eklenmiş ve 30 sn inkübe edilmiştir (Tamponlardan gelen tuzları alkol yardımı ile uzaklaştırmak amacı ile bu basamak uygulanmıştır)

- Ependorf tüpleri içinde kalan etanol, mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve ependorf tüplerinin kapakları açılarak kurumaya bırakılmıştır.
- Her bir örneğe 27 µl nükleaz-içermeyen su (65°C) (160010429) eklenmiş (boncuklara tutunan RNA'ların serbest kalması amacı ile) ve iyice homojenize edilmiştir. Sonrasında, bir önceki aşamalarda amplifiye edilen RNA örneklerinin (aRNA'lar) saflıkları ve konsantrasyonları bir kez daha spektrofotometrik yöntemle (NanoDrop 2000C, Thermo Sci.) belirlenmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1 aRNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri

Örnek no	A _{260/280}	Konsantrasyon (ng/µl)	Örnek no	A _{260/280}	Konsantrasyon (ng/µl)
1	2.10	566.1	14	2.09	446.1
2	2.12	563,2	15	2.09	429.9
3	2.09	472,7	16	2.09	358.1
4	2.10	497,5	17	2.09	418
5	2.11	617	18	2.09	416.7
6	2.10	433,2	19	2.09	412.8
7	2.10	438,7	20	2.09	446.3
8	2.10	471,2	21	2.10	451.1
9	2.10	384,5	22	2.09	404
10	2.08	488,2	23	2.09	413.2
11	2.11	460,2	24	2.09	435.5
12	2.09	373,9	25	2.07	387.2
13	2.13	516,9			

VI. İkinci-döngü ss-cDNA sentezi

Kitle birlikte sağlanan ikinci döngü primerleri (902099), enzimi (902100) ve tamponu (902101) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu basamak, yeni cDNA için primerlerin bağlanması aşamasıdır.

- Her bir örnekte toplam 625 ng/µl olacak şekilde pürifiye cRNA örneği hazırlanmıştır (24 µl nükleaz-içermeyen su içinde 15 µg cRNA'ya eşittir).
- Her bir örneğe 4 µl ikinci döngü primerleri eklenmiş (toplam hacim 28 µl) ve iyice homojenize edilmiştir. Örnekler 70°C'de 5 dk, 25°C'de 5 dk ve 4°C'de 2 dk inkübasyonu içeren tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiş ve primerlerin bağlanma aşaması gerçekleştirilmiştir.
- Bir önceki aşamada elde edilen her bir örneğe 4 µl ikinci döngü ss-cDNA enzimi ve 8 µl ikinci döngü ss-cDNA tamponu eklenerek yeni bir karışım hazırlanmış ve homojenize edilmiştir. Örnekler 25°C'de 10 dk, 42°C'de 90 dk, 70°C'de 10 dk, ve 4°C'de 2 dk inkübasyonu içeren tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla

thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiş ve reverse transkripsiyon aşaması gerçekleştirilerek RNA'dan cDNA örneği elde edilmiştir.

VII. RNaz H kullanılarak RNA hidrolizi

Kitle birlikte sağlanan RNaz H enzimi (902222) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu basamak, bir önceki aşamada geride kalan ve çevrilmeyen RNA'ların enzim yardımı ile hidrolize edilerek uzaklaştırılması amacıyla uygulanan bir basamaktır.

- Her bir örneğe (toplam 40 µl) 4 µl RNaz H eklenmiş ve iyice homojenize edilmiştir. Örnekler 37°C'de 45 dk, 95°C'de 5 dk ve 4°C'de 2 dk inkübasyonu içeren tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiş ve ortamda eğer varsa RNA'ların uzaklaştırılması aşaması gerçekleştirilmiştir.

VIII. İkinci döngü ss-cDNA Pürifikasyonu

Kitle birlikte sağlanan magnetik boncuklar (901893) kullanılarak, bir önceki aşamada elde edilen cDNA örneklerinin pürifikasyon aşaması tamamlanmıştır.

- İnkübasyon sonrası her bir örnek üzerine 11 µl nükleaz-içermeyen su eklenmiş ve ikinci döngü ss-cDNA pürifikasyon aşamasına geçilmiştir.

- Örneklerin üzerine, kitle birlikte sağlanan pürifikasyon boncuklarından 100 µl eklenmiş ve 10 kez alt-üst yapılarak homojenize olması sağlanmıştır. Homojenizasyon sonrası her bir ss-cDNA/boncuk örneğine 150 µl %100'lük etanol eklenmiş ve 20 dk inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyon sonrası ependorflar manyetik standa yerleştirilmiştir (6'lı). Bead'ler miknatısa tutununca geri kalan sıvı mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır.

- Her bir örneğe 200 µl %80'lik etanol eklenmiş ve 30 sn inkübasyondan sonra mikropipet yardımı ile etanol uzaklaştırılmıştır. Ependorf tüplerinin kapakları açılarak kurumaya bırakılmıştır.

- Her bir örneğe 30 µl nükleaz-içermeyen su (65°C) (160010429) eklenmiş (boncuklara tutunan ss-cDNA'ların serbest kalması amacı ile) ve iyice homojenize edilmiştir. Örnekler -20°C'de (overnight) saklanmıştır.

3.gün**VIII. -Saf ss-cDNA miktar tayini**

Örnekler -20°C'den çıkartılmış ve NanoDrop yardımı ile ss-cDNA miktarları ölçülmüştür (Tablo 3.2). Tüm örnekler 5500 ng ss-cDNA ve son hacmi 31,2 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.2 ss-cDNA miktarları

Örnek sayısı	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
1	207,6	6,292	3,067	2,05	2,25
2	267,8	8,114	3,946	2,06	2,25
3	189,7	5,75	2,831	2,03	2,24
4	202,7	6,143	3,287	1,87	1,76
5	299,9	9,086	4,445	2,04	2,22
6	220,6	6,684	3,269	2,04	2,2
7	196,2	5,945	2,903	2,05	2,21
8	223,9	6,783	3,306	2,05	2,21
9	195,4	5,922	2,9	2,04	2,22
10	204,3	6,190	3,011	2,06	2,19
11	204,5	6,196	3,034	2,04	2,19
12	131,5	3,985	1,191	2,08	2,23
13	257,5	7,802	4,009	1,95	1,98
14	167,4	5,073	2,493	2,04	2,16
15	174,4	5,285	2,584	2,05	2,22
16	136,2	4,128	2,028	2,04	2,22
17	159	4,817	2,359	2,04	2,22
18	188,6	5,716	2,787	2,05	2,21
19	165,9	5,027	2,464	2,04	2,20
20	237,2	7,188	3,518	2,04	2,18
21	178,4	5,405	2,624	2,06	2,19
22	172,9	5,239	2,564	2,04	2,2
23	152,3	4,614	2,278	2,03	2,14
24	173,5	5,258	2,590	2,03	2,19
25	101,9	3,088	1,517	2,04	2,17

X. Fragmentasyon aşaması

Kitle birlikte sağlanan UDG (900719) ve APE1 (900715) enzimlerinin yanısıra DNA işaretleme karışımı (10x cDNA fragmentasyon tamponu) (900717) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- Fragmentasyon aşamasında ilk olarak fragmentasyon karışımı hazırlanmıştır. Bu amaçla örnek başına 10 µl nükleaz içermeyen su, 4,8 µl 10x c-DNA fragmentasyon tamponu (900717), 1 µl UDG (900719), 1 µl APE 1 (1000U/µl (900715) olacak şekilde toplamda 16.8 µl karışım hazırlanmıştır. Bu karışımın üzerine bir önceki basamakta elde edilen ss-cDNA örneklerinden 31,2 µl eklenmiş ve vorteks yardımı ile homojenize edilmiştir. Örnekler 37°C'de 1 saat, 93 °C'de 2 dk, 4°C'de inkübasyonu içeren tek bir

döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiştir.

XI. Etiketleme aşaması

- Örnek başına 15 µl'lik karışım hazırlanmıştır. Bu karışım 12 µl 5x TdT buffer (900679), 1 µl DNA labelling Reagent (900713), 2 µl TdT, 30 U/µl (enzim) içermiş ve bir önceki basamakta elde edilen karışıma eklenmiştir. Örnekler 37°C'de 1 saat, 70°C'de 10 dakika, 4°C'de dakika inkübasyonu içeren tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiştir.

XII. Hibridizasyon aşaması

Kitle birlikte sağlanan 4 farklı hibridizasyon tamponu [Hibridizasyon-part 1 (902433), Hibridizasyon-part 2 (902434), Hibridizasyon-part 3 (902435) ve Hibridizasyon-part 4 (902436)], kontrol oligonükleotid B2 (900298) ve 20x hibridizasyon kontrolü (900455) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon; hibridizasyon karışımının hazırlanması, örneklerin mikroarray chip'lerine yüklenmesi ve hibridizasyon fırınında inkübasyon olmak üzere 3 aşamada tamamlanmıştır.

A. Hibridizasyon karışımının hazırlanması

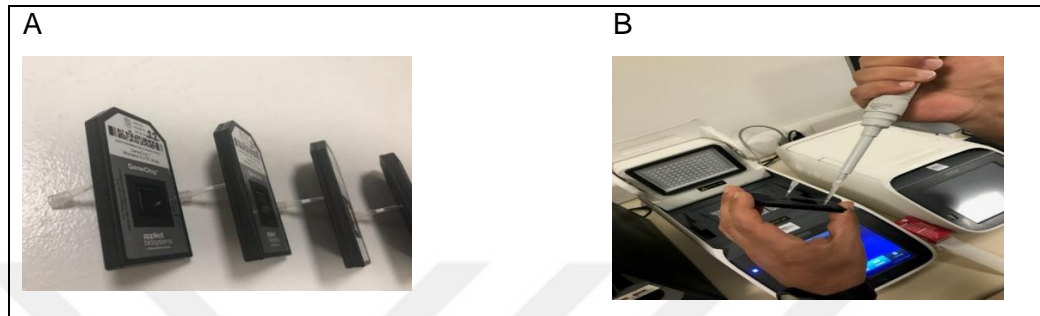
- İlk olarak 4 farklı hibridizasyon tamponu kullanılarak 2x hibridizasyon karışımı hazırlanmıştır. Bu amaçla örnek başına toplamda 86 µl olacak şekilde 75 µl hibridizasyon-part 1, 6,8 µl Hibridizasyon-part 2, 3,2 µl hibridizasyon-part 3 ve 1 µl hibridizasyon-part 4 içeren karışım hazırlanmıştır.

- Her bir örnek başına 2,5 µl kontrol oligonükleotid B2, 7,5 µl 20x hibridizasyon kontrolü 85,5 µl 2x hibridizasyon karışımı ve 13,5 µl nükelaz içermeyen su içeren yeni bir hibridizasyon tamponu hazırlanmıştır.

- Etiketleme aşamasından sonra elde edilen örneklerden 41 µl alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine yeni hazırlanan hibridizasyon tamponundan 109 µl eklenmiş ve vorteks yardımı ile homojenize edilmiştir. Örnekler, her ne kadar ss-cDNA olsalar da, sekonder katlanmaların oluşabileceği ve bu nedenle de hibridizasyonun gerçekleşmeyeceği olasılığı nedeniyle 95°C'de 10dk, 40°C'de 3dk inkübasyonu içeren tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiştir.

B. Örneklerin mikroarray chiplerine yüklenmesi

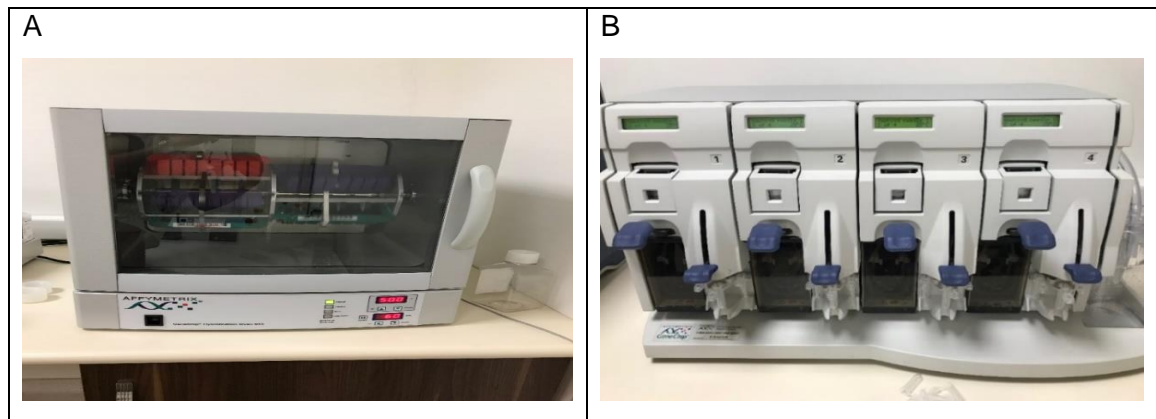
İnkübasyon sonrası, örneklerden 130 µl alınarak mikroarray chip'lere yüklenmiştir. Yükleme öncesi mikroarray chip'lerin arkasında bulunan boşluklara mikropipet uçları yerleştirilmiş ve böylelikle yükleme yapılırken içerideki havanın dışarıya atılması sağlanmıştır. Yükleme tamamlandıktan sonra, mikropipet uçları çıkarılmış ve boşluklar özel bantların (Though- Spot Microtube USA Diversifie DBiotech) yardımı ile kapatılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 mikroarray chip'lere örneklerin yüklenmesi

C. Mikroarray chiplerin hibridizasyon fırınında inkübe edilmesi

Mikroarray chipleri daha önceden 50°C'ye ısıtılmış hibridizasyon fırınına (Affymetrix GeneChip Hybridization Oven) yerleştirilmiş ve 60 rpm'de 18 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.4 A).



Şekil 3.4 Mikroarray chiplerin hibridizasyon fırınında inkübe edilmesi ve yıkaması

4.gün

XIII. Yıkama Aşaması

- Yıkama aşaması Affymetrix Gene Chip 1-888-DNA-Chip (362-2447) Fluidi CS cihazında tamamlanmıştır (Şekil 3.4 B) . Bu amaçla cihazda bulunan yıkama ünitesindeki 1 numaraya 600 µl Stain Buffer 1 (902440), 2 numaraya 600 µl Stain Buffer 2 (902441), 3 numaraya 800 µl Array Holding Buffer (902442) yerleştirilmiştir.

Ayrıca yıkama ünitesinde yıkama tamponları için ayrılan bölümlere de Yıkama Tamponu A (902438) ve Yıkama Tamponu B (902439) yerleştirilmiştir.

- Mikroarray chiplerin arkasındaki bantlar çıkartılmıştır. Yıkama blokları açılmış ve sırasıyla mikroarray chipleri yerleştirilmiştir. Her bir örnek için yıkama aşaması yaklaşık 1 saat 19 dakika sürmüştür. Yıkama işlemi tamamlanınca mikroarray chiplerinin üzerinde bulunan boşluklar yine özel bantlarla kapatılmıştır.

XIV. Tarama Aşaması

- Tüm örneklerin yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, analiz aşamasına geçilmiştir. Mikroarray sisteminde yer alan yazılıma örnek sayısı ve kullanılan mikroarray tipi belirtildikten sonra tarama işlemi başlatılmış ve tamamlanmıştır (Affymetrix GeneChip Scanner 1-888-DNA-CHIP-(362-2447)).

3.10. Mikroarray Verilerinin Verifikasyonu;

Whole-transkriptom analizi sonrasında, elde edilen verilerin verifikasyonu amacı ile en dramatik ekspresyon değişimlerini gözlemlediğimiz 3 adet gene (Acta1, Cycs, ve Tnni2) ait ekspresyon değişimleri gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile konfirme edilmiştir. Bu amaçla öncelikle hedeflenen bu genlere ve referans gen olarak seçilen β -aktine özgün primer-Taqman problrarı karışımlarını içeren single assay kitleri (Roche Diagn.) kullanılarak gerçek-zamanlı PCR (LightCycler 2.0, Roche Diagn.) ile ekspresyon değişimleri relatif olarak belirlenmiştir. Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda özetlenmiştir:

A. İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi

- Bu amaçla ticari kit (Evoscript universal cDNA master, Roche Diag.) kullanılmıştır. Herbir örnek için aşağıda belirtilen reaksiyon karışımı hazırlanmıştır:

Komponent	Miktar
Reaksiyon tamponu (5x)	4.0 μ l
Total RNA	1 μ g
PCR-grade su	(her örnek için ayrı hesaplandı)
Enzim (10x)	2 μ l
Toplam hacim	20 μ l

- Örnekler hazırlandıktan sonra 42°C'de 15 dk, 85°C'de 5 dk, 65°C'de 15 dk ve 4°C'de 0 saniye inkübasyonu içeren tek bir döngüden oluşan koşulların gerçekleştirilmesi amacıyla thermal cycler cihazına (SimpliAmp, Life Sci.) yerleştirilmiştir ve total RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

B. Gerçek-zamanlı PCR ile relatif kantitasyon

- Elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak, aşağıda belirtildiği şekli ile reaksiyon karışımı hazırlanmıştır:

Komponent	Miktar
Fast Start Essential DNA Probe Enzimi (2x)	10 µl
Single assay	1 µl
PCR-grade su	5 µl
cDNA örneği	4 µl
Toplam hacim	20 µl

- Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra, aşağıda belirtildiği şekli ile reaksiyon protokolü uygulanmıştır:

Analiz modu	Döngü	Segment	Isı	Süre	Kazanım modu
Pre-inkübasyon	1		95 °C	10 dk	-
Amplifikasyon	40	Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
		Annealing	60 °C	30 sn	-
		Ekstensiyon	72 °C	1 sn	Single
Soğutma	1		40 °C	30 sn	-

Gerçek zamanlı PCR sonrasında, hedef genlerde gözlenen katlı değişimin hesaplanmasında

$\Delta\Delta CT$ analizi kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan formüller aşağıda sırası ile belirtilmiştir:

$$\Delta CT (\text{kontrol}) = CT (\text{hedef gen}) - CT (\beta\text{-aktin})$$

$$\Delta CT (\text{örnek}) = CT (\text{Hedef gen}) - CT (\beta\text{-aktin})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{örnek}) - \text{ortalama } \Delta CT (\text{kontrol})$$

$$\text{Katlı değişim} = E^{(-\Delta\Delta CT)}$$

Her bir örnek birbirinden bağımsız 3 kez çalışılmış ve katlı değişim hesaplamasında bu 3 değerın ortalaması alınarak veriler sunulmuştur.

3.11. Hedef Sinyal İletim Yolaklarının Belirlenmesi;

Whole-transkriptom analiz sonucunda farklı düzeyde eksprese oldukları belirlenen genlerin listesi, mikroarray sisteminde kayıtlı donanımlar kullanılarak hem grafiksel olarak hem de excel dosyası olarak elde edilmiştir. Bu hedef genlerin yer aldığı sinyal iletim yolaklarının belirlenmesi amacıyla internette bulunan kamuya açık veri tabanları kullanılmıştır.

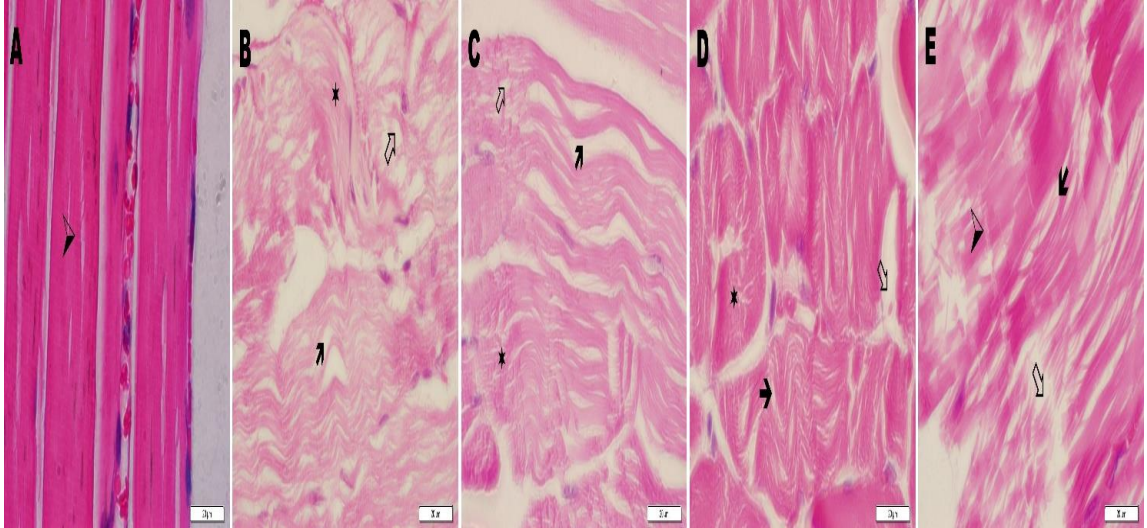
3.12. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 24.0 paket programı ile analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm Standart Sapma, ortanca (minimum ve maksimum değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Fizyolojik ve histolojik veriler için bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve posthoc incelemeler için Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Mikroarray analiz protokollerinin tüm basamakları Affymetrix Mikroarray Platformu (Affymetrix, USA) kullanılarak tamamlanmıştır. Analiz aşamalarında Affymetrix tarafından ücretsiz sağlanan Expression Console ve Transcriptome Analysis Console (TAC) programları kullanılmış ve mikroarray verileri için öncelikle CEL dosyaları elde edilmiştir. Expression Console yazılımı ile CEL dosyaları kullanılarak, verilerin normalizasyonları yapılmıştır. Aynı program ile kalite kontrol değerlendirmeleri de yapıldıktan sonra, TAC programı ile ileri analize geçilerek gruplar arasındaki gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar (Fold Change, p-value vb.) özgün filtreler kullanılarak belirlenmiştir. Mikroarray verileri için bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve posthoc incelemeler için Tukey testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık $p < 0.05$ gözlemlendiğinde kabul edilmiştir. Yukarıda belirtilen programlar kullanılarak ayrıca, PCA (Principle Component Analysis) yapılarak örnek dağılımları incelenmiştir. Signal Box Plot analizi ile normalizasyon sonrası herbir grupta elde edilen verilerin ortak bir medyanda toplanıp toplanmadıkları değerlendirilmiştir. Mikroarray verileri kullanılarak bir Heat Map analizi yapılmış ve çalışmada değerlendirilen örneklerle ait ekspresyon profilleri gözlenmiştir.

4. BULGULAR

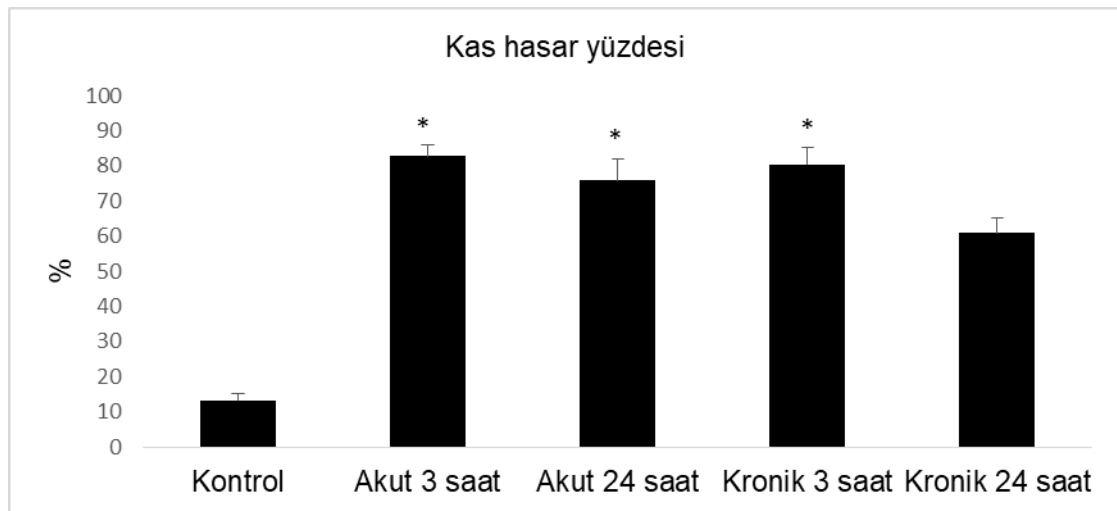
4.1. Histolojik İncelemeler:

Kontrol ve egzersiz gruplarından alınan Gastrocnemius-soleus kas kompleksine ait kesitler Şekil 4.1 de gösterilmiştir. Kontrol grubunda kas dokusu normal görünümde izlenmiştir. Bu grupta nekrotik görünümlü kas hücrelerine ve polinükleer ile mononükleer hücre infiltrasyonuna rastlanmamıştır (Şekil 4.1 A). Deney gruplarında ise kas dokusunda bütünlüğün kaybolduğu, kas liflerinde yer yer açılma ve ayrılmaların; liflerde dalgalanmaların olduğu izlenmiştir. Bazı kas liflerinde çizgilenmenin bozulduğu ve belirgin polinükleer ve mononükleer hücre infiltrasyonun olduğu izlenmiştir (Şekil 4.1 B-E). Akut 3 saatlik grupta (Şekil 4.1 B) dikkat çekici düzeyde kas liflerinde dalgalanmalar ve lifler arasında açılmalar gözlenmektedir. Enine geçmiş kesitlerde kas lifinin ortasında erimelerin olduğu ve liflerde bütünlüğün kaybolduğu izlenmiştir. Tüm gruplarda görünümün birbirine benzemesine karşın Kronik 24 saatlik grupların diğer gruplara nazaran daha az dejeneratif görünüme sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm gruplarda kas rejenerasyonunu gösteren merkezi yerleşimli çekirdeğe sahip kas lifleri çok az sayıda izlenmiştir. Bununla birlikte; kas rejenerasyonu için immunohistokimyasal analizlerin yapılması sonuçların daha net olarak ortaya konmasını sağlayacaktır.

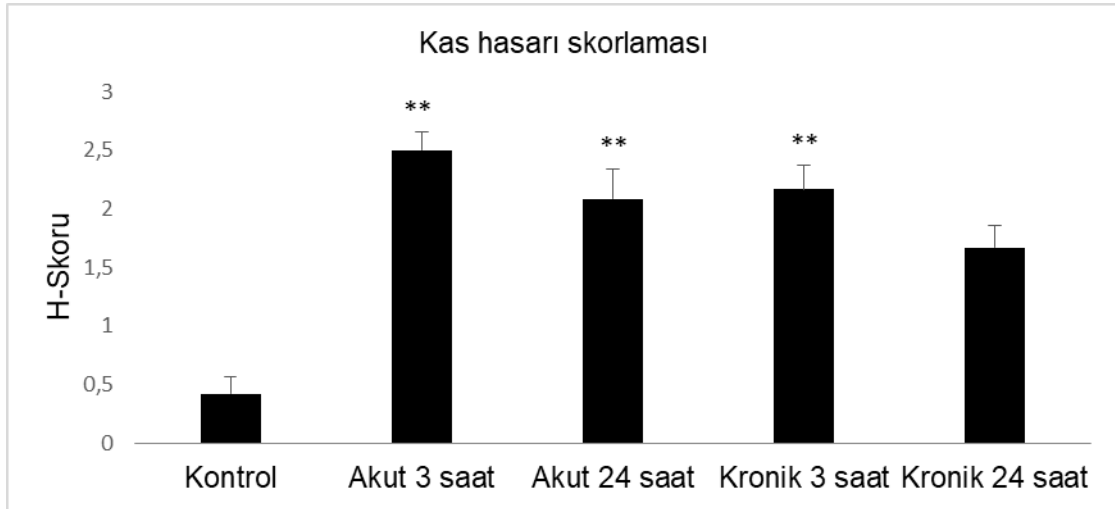


Şekil 4.1 Kontrol ve egzersiz gruplarından alınan Gastrocnemius-soleus kas kompleksine ait kesitler. İçi dolu ok; kas lifleri arasındaki ayrılmaları; ok başı Z çizgilerini; asteriks kas liflerini; boş ok; doku kayıpları olan alanları göstermektedir. A; kontrol grubu, B; Akut 3 saat, C; Akut 24 saat, D; Kronik 3 saat, E; Kronik 24 saat grubu. Hematoksilen&Eozin, Bar: 20µm, X1000

Kas hasarı yüzdesi ve H-skoru verileri sırasıyla Şekil 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir. Tüm gruplarda bu iki parametre kontrole göre yüksek olarak bulunmuştur. Bununla beraber; akut 3 saat, akut 24 saat ve kronik 3 saat gruplarındaki kas hasar yüzdesi ve H-skordaki artışlar istatistiksel olarak önemli düzeydeyken (sırasıyla, $p < 0,05$ ve $p < 0,001$); kronik 24 saat grubunda her iki parametredeki artış istatistiksel olarak önemli düzeye ulaşmamıştır. Kas hasarı yüzdesi ve H-skorunda egzersiz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

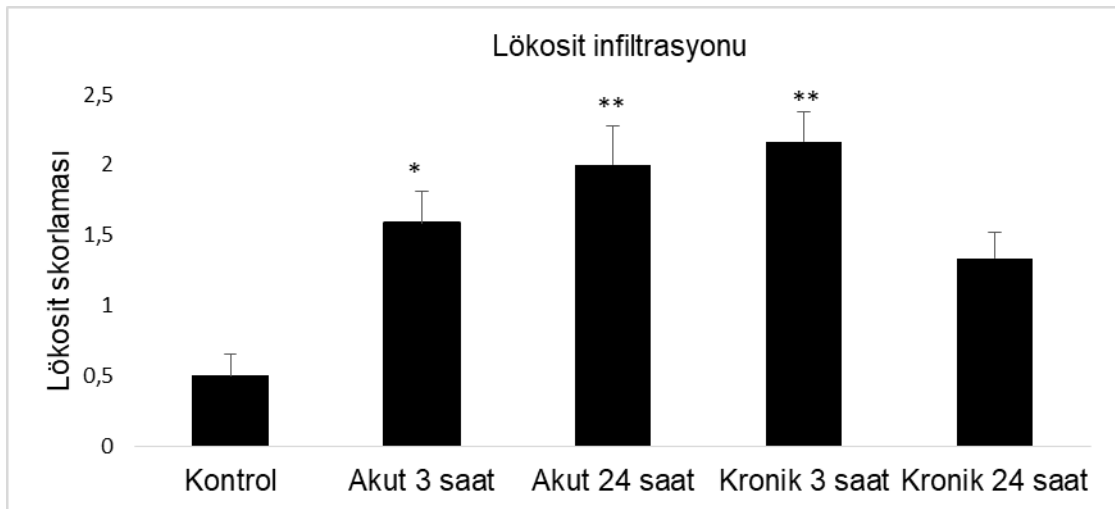


Şekil 4.2 Grupların kas hasarı yüzdeleri. Ortalama±SS. *: $p < 0,05$ kontrol grubundan fark.



Şekil 4.3 H-skoruna göre kas hasarı belirlenmesi. Ortalama±SS. **: $p < 0,001$ kontrol grubundan fark.

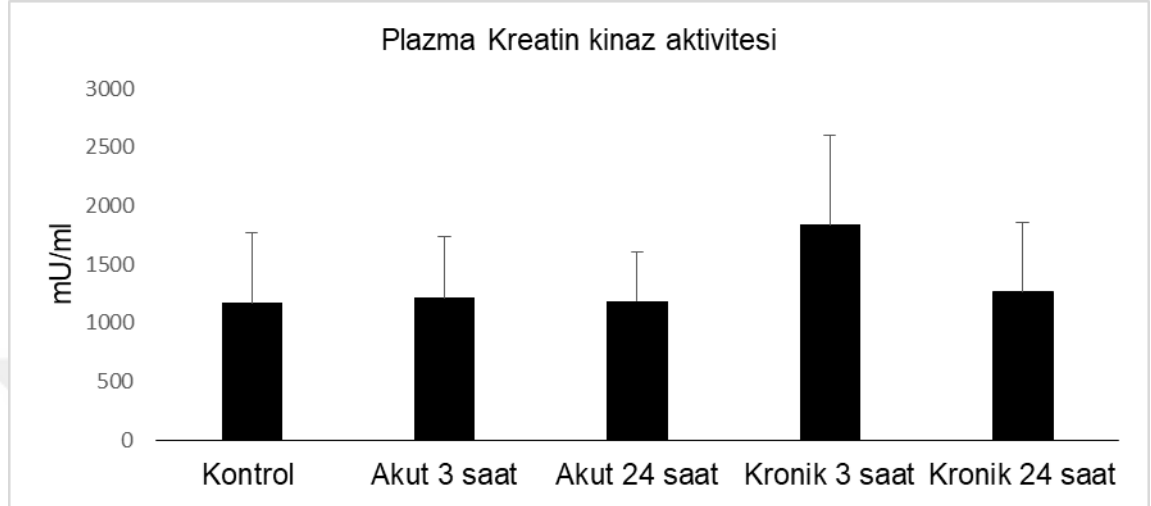
Lökosit infiltrasyonu ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Tüm egzersiz gruplarında kontrole göre artmış lökosit infiltrasyonu tespit edilmiştir. Akut 3 saat ($p < 0,05$) ile akut 24 saat ve kronik 3 saat ($p < 0,001$) gruplarında gözlenen lökosit infiltrasyonu artışı kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeydeyken; kronik 24 saat grubunda gözlenen değişim istatistiksel olarak önemli düzeye ulaşmamıştır.



Şekil 4.4 Deney gruplarında gözlenen lökosit infiltrasyonu. Ortalama±SS. *: $p < 0,05$ kontrol grubundan fark, **: $p < 0,001$ kontrol grubundan fark.

4.2. Plazma CK Aktivitesi İncelemeleri:

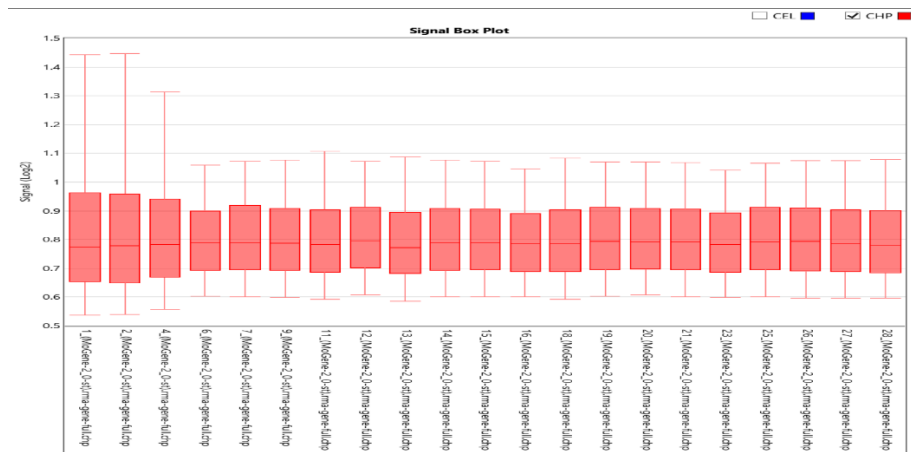
Uygulanan egzersiz protokolleri gruplar arasında plazma CK aktivitesi değerleri açısından istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farka sebep olmamıştır (Şekil 4.5).



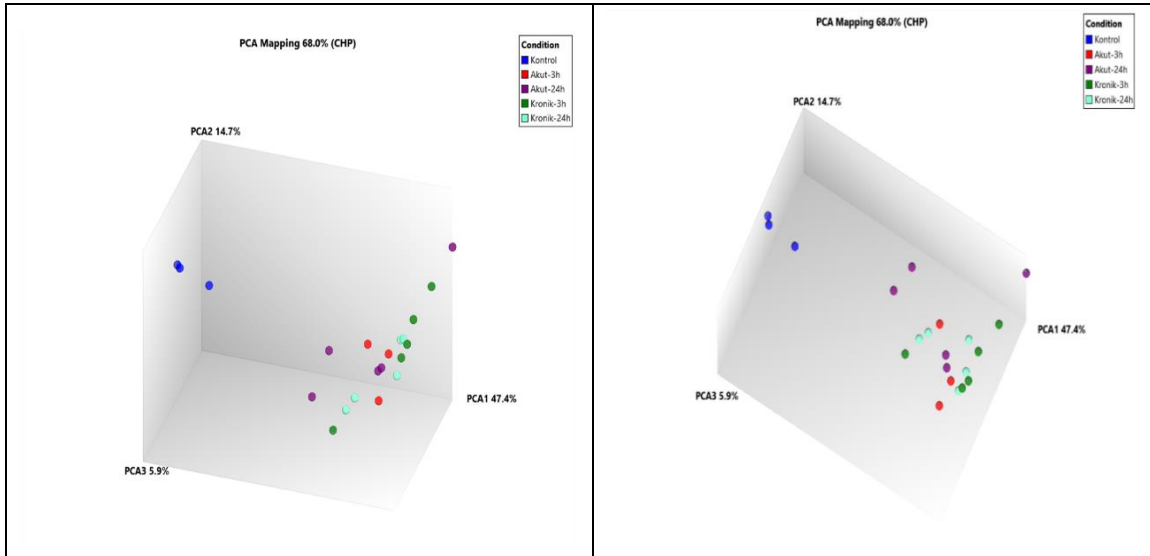
Şekil 4.5 Grupların plazma CK aktivite düzeyleri. Ortalama±SS.

4.3. Whole Transkriptom Analiz Verileri;

PCA (principal component analysis) analizleri sonucu deneklerin birbirleriyle olan genetik yakınlıkları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Aynı gruptaki denekler aynı renkler ile işaretlenmiştir. PCA haritalaması kontrol grubunun yüzme gruplarından belirgin olarak ayrıldığını göstermektedir.



Şekil 4.6 Normalizasyon sonrası elde edilen verilerin ortak bir meridyende toplandıklarını gösteren Signal box plot grafiği



Şekil 4.7 PCA (principal component analysis) analizleri ile örneklerin dağılımı

PCA farklı gruptaki örneklerden elde edilen verilerin dağılımını gösterir (Şekil 4.7).

m. Gastrocnemius-soleus kas komplekslerinden izole edilen RNA örneklerinden yapılan Whole-transkriptom analizi sonucunda; akut 3 saat ile kontrol grubu karşılaştırılmasında 8 gende up-regülasyon, 1764 gende down-regülasyon gözlemlenirken (Tablo 4.1), akut 24 saat ile kontrol grubu karşılaştırılmasında 1 gende up-regülasyon, 1665 gende down-regülasyon izlenmiştir (Tablo 4.2). Uzun süreli yüzme egzersizi yapan gruplarla kontrol grubu karşılaştırıldığında; kronik 3 saat grubunda kontrole göre 17 gende up-regülasyon, 1931 gende down-regülasyon gözlemlenmiştir (Tablo 4.3). Kronik 24 saat grubunda ise kontrole göre 13 gende up-regülasyon, 1823 gende down-regülasyon gözlemlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.1-4.4 incelendiğinde; tüm egzersiz gruplarında kontrol grubuna kıyasla karbonik anhidraz 3 (*Car3*), nebulin (*Neb*), obskurin (*Obscn*), titin (*Ttn*), insülin benzeri büyüme faktörleri bağlayıcı protein 5 (*Igfbp5*), insülin benzeri büyüme faktörleri bağlayıcı protein 7 (*Igfbp7*), Glikojen sentaz kinaz 3 β (*Gsk3 β*) ve ubiquitin spesifik proteaz 2 (*Usp 2*) genlerinde down-regülasyon görülmüştür. Bu genlere ek olarak kronik 3 saat grubunda aktin alfa 1 iskelet kası (*Acta1*), kreatin kinaz kas (*Ckm*), troponin I iskelet hızlı 2 (*Tnni2*) ve kronik 24 saat grubunda *Acta1* genleri kontrol grubuna kıyasla down-regüle olmuştur. Tüm down-regüle olan genlerde bu katlı değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. En dramatik down-regülasyon kronik 3 saat grubu, kontrol grubuna göre kıyaslandığında *acta1* geninde gerçekleşmiştir (-128 kat, $p < 0,001$). Aynı gen kronik 24 saat grubunda kontrol grubuna göre 19 kat down-

regüle olmuştur ($p=0,022$). Kronik yüzme 3 saat grubunda kontrol grubuna göre *Ckm* (-53 kat, $p<0,001$) ve *Tnni2* (-24 kat, $p<0,001$) down-regüle olmuştur. Kronik yüzme 3 saat grubu ile karşılaştırıldığında akut yüzme 3 saat grubunda; *Ckm* (17 kat, $p=0,03$), *Acta1* (34 kat, $p=0,04$) ve *Tnni2* (15 kat, $p=0,04$) 'nin upregüle olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte bu iki grup karşılaştırılmasında *Tnnt3*'te de (20 kat, $p=0,04$) up-regülasyon gözlemlenmiştir.

Tablo 4.5-4.8 egzersiz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında elde edilen sonuçları göstermektedir. Akut yüzme 24 saat grubunda, kronik yüzme 24 saat grubuna göre *Cyca* (6 kat, $p=0,04$) upregüle olmuştur (Tablo 4.6). Benzer şekilde, akut yüzme 24 saat grubunda *Cyca* akut yüzme 3 saat grubuna göre (6 kat, $p=0,01$) upregüle olmuştur (Tablo 4.7). Kronik yüzme 24 saat grubunda, kronik yüzme 3 saat grubuna göre *Ndufb9* (15 kat, $p=0,04$) upregüle olmuştur (Tablo 4.8).

Tablo 4.1 Akut 3 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

Akut 3 Saat ile Kontrol Grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. Nebulin	<i>Neb</i>	-45,75	$p<0,001$
2. Titin	<i>Ttn</i>	-28,55	$p<0,001$
3. Karbonik anhidraz 3	<i>Car3</i>	-53,17	$p<0,001$
4. Obskurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	<i>Obscn</i>	-3,71	$p<0,001$
5. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 5	<i>Igfbp5</i>	-3,75	$p<0,001$
6. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 7	<i>Igfbp7</i>	-2,4	$p<0,001$
7. Glikojen sentaz kinaz 3 β	<i>Gsk3β</i>	-2,16	$p<0,001$
8. Ubiquitin spesifik proteaz 2	<i>Usp 2</i>	-3,95	$p<0,001$

Tablo 4.2 Akut 24 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

Akut 24 Saat ile Kontrol Grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. Nebulin	<i>Neb</i>	-61,55	p<0,001
2. Titin	<i>Ttn</i>	-30,51	p<0,001
3. Karbonik anhidraz 3	<i>Car3</i>	-62,73	p<0,001
4. Obskurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	<i>Obscn</i>	-3,65	p<0,001
5. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 5	<i>Igfbp5</i>	-3,4	p<0,001
6. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 7	<i>Igfbp7</i>	-2,22	p<0,001
7. Glikojen sentaz kinaz 3 β	<i>Gsk3β</i>	-2,18	p<0,001
8. Ubiquitin spesifik proteaz 2	<i>Usp 2</i>	-3,45	p<0,001

Tablo 4.3 Kronik 3 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

Kronik 3 Saat ile Kontrol Grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. Nebulin	<i>Neb</i>	-69,27	p<0,001
2. Titin	<i>Ttn</i>	-30,69	p<0,001
3. Karbonik anhidraz 3	<i>Car3</i>	-66,13	p<0,001
4. Obskurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	<i>Obscn</i>	-3,77	p<0,001
5. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı proteinler 5	<i>Igfbp5</i>	-3,76	p<0,001
6. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı proteinler 7	<i>Igfbp7</i>	-2,14	p<0,001
7. Glikojen sentaz kinaz 3 β	<i>Gsk3β</i>	-2,17	p<0,001
8. Aktin, alfa 1, iskelet kası	<i>Acta1</i>	-128,28	p<0,001
9. Ubiquitin spesifik proteaz 2	<i>Usp 2</i>	-3,70	p<0,001
10. Kreatin kinaz, kas	<i>Ckm</i>	-53,06	p<0,001
11. Troponin I, iskelet, hızlı 2	<i>Tnni2</i>	-24,71	p<0,001

Tablo 4.4 Kronik 24 saat ile kontrol grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

Kronik 24 Saat ile Kontrol Grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. Nebulin	<i>Neb</i>	-61,59	p<0,001
2. Titin	<i>Ttn</i>	-30,28	p<0,001
3. Karbonik anhidraz 3	<i>Car3</i>	-63,85	p<0,001
4. Obskurin, hücre iskeleti kalmodulin ve titin-RhoGEF etkileşim	<i>Obscn</i>	-3,7	p<0,001
5. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 5	<i>Igfbp5</i>	-3,39	p<0,001
6. İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri bağlayıcı protein 7	<i>Igfbp7</i>	-2,07	p<0,001
7. Glikojen sentaz kinaz 3 β	<i>Gsk3β</i>	-2,17	p<0,001
8. Ubiquitin spesifik proteaz 2	<i>Usp 2</i>	-3,71	p<0,001
9. Aktin, alfa 1, iskelet kası	<i>Acta1</i>	-19,41	0,022

Tablo 4.5 Akut 3 saat ile kronik 3 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

Akut 3 Saat ile Kronik 3 Saat Grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. Aktin, alfa 1, iskelet kası	<i>Acta1</i>	34,03	0,048
2. Troponin I, iskelet, hızlı 2	<i>Tnni2</i>	14,98	0,0453
3. Kreatin kinaz, kas	<i>Ckm</i>	17,24	0,0319
4. Troponin T3, iskelet, hızlı	<i>Tnnt3</i>	20,18	0,0434

Tablo 4.6 Akut 24 saat ile kronik 24 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

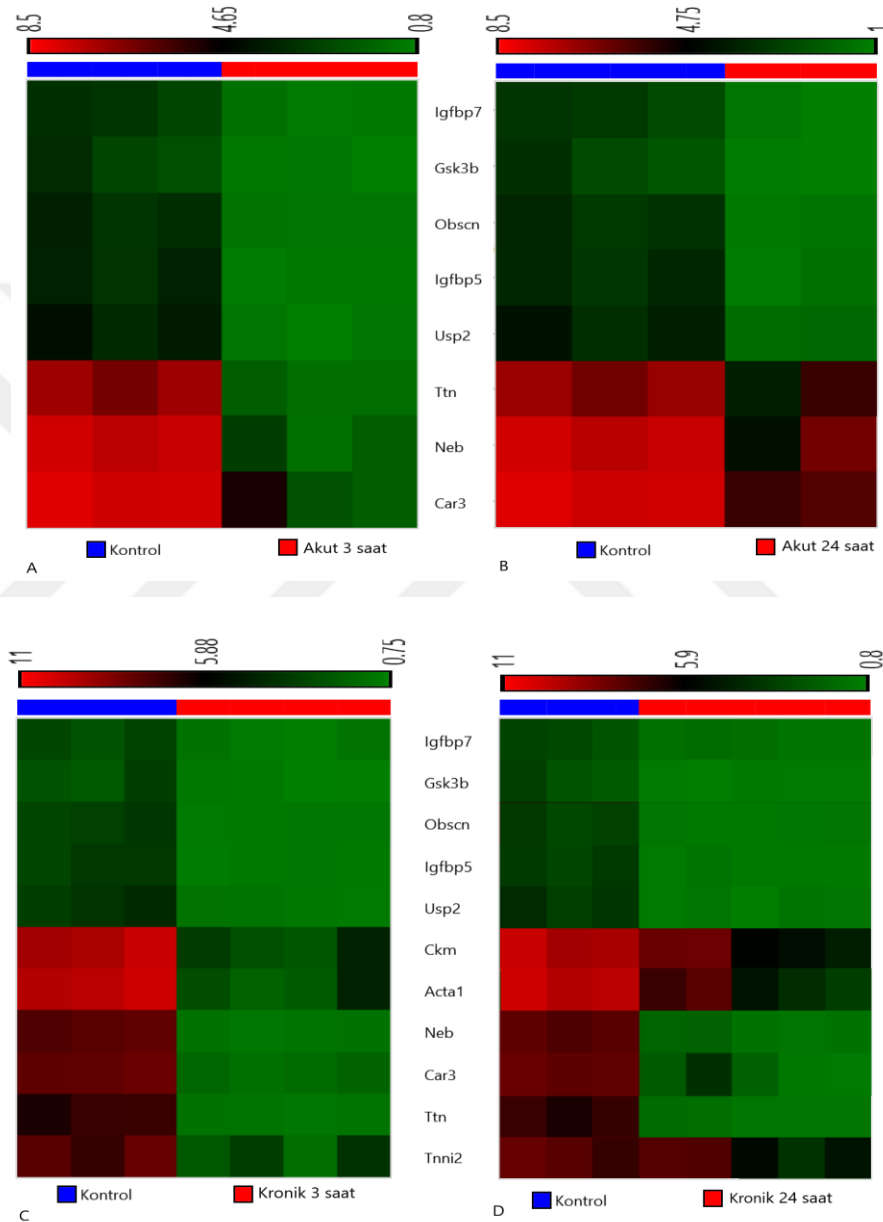
Akut 24 saat ile Kronik 24 saat grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. Sitokrom c, somatik	<i>Cyts</i>	5,91	0,0443

Tablo 4.7 Akut 24 ile akut 3 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

Akut 24 ile Akut 3 Saat Grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. Sitokrom c, somatik	<i>Cyts</i>	6,01	p<0,001

Tablo 4.8 Kronik 24 ile kronik 3 saat grubunun affymetrix microarray analizi katlı değişim karşılaştırılması

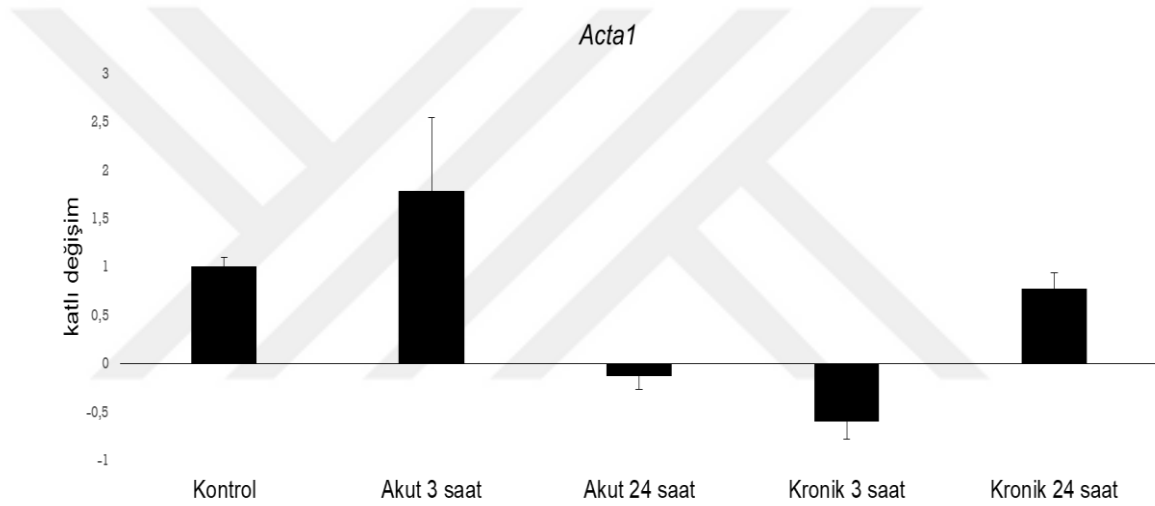
Kronik 24 ile Kronik 3 saat Grubu Karşılaştırılması			
Gen adı	Gen sembolü	Katlı değişim	p değeri
1. NADH dehidrogenaz (Ubikinon) 1 beta subkompleks, 9	<i>Ndufb9</i>	15,17	0,0396



Şekil 4.8 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında egzersize yanıt olarak ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlenen genlere ait heat map. Kırmızı renk ifadesinde artış olan, yeşil renk ise ifadesinde azalma olan genleri göstermektedir. A: Akut 3 saat grubunun Kontrol grubu ile karşılaştırılması, B: Akut 24 saat grubunun Kontrol grubu ile karşılaştırılması, C: Kronik 3 saat grubunun Kontrol grubu ile karşılaştırılması, D: Kronik 24 saat grubunun Kontrol grubu ile karşılaştırılması.

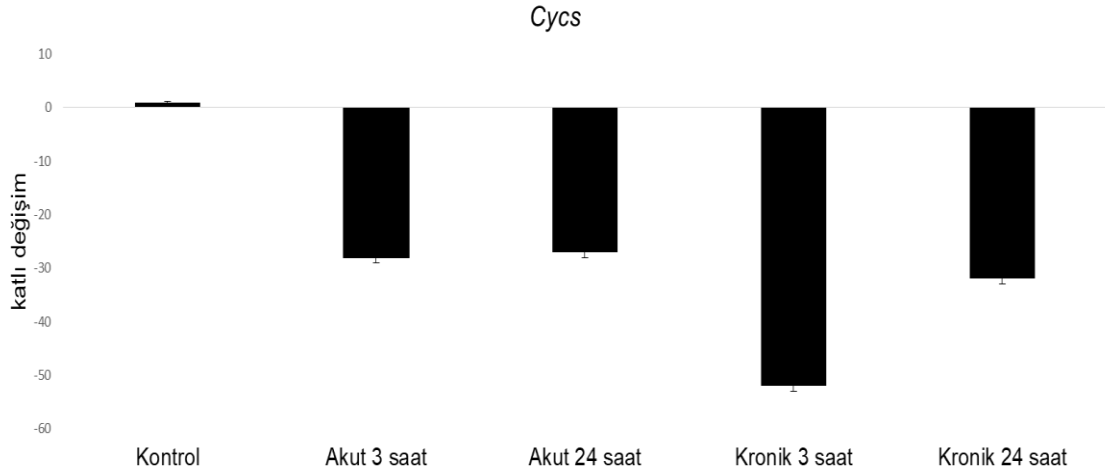
4.4. Mikroarray analiz verilerinin validasyonu:

Çalışmaya dahil edilen gruplara ait kas doku örneklerinde Whole-transkriptom analizinde en dramatik ekspresyon değişimlerini gözlemlediğimiz *Acta1*, *Cyca*, *Tnni2* genleri mRNA ekspresyon düzeyleri β -aktin geni mRNA düzeyine göre real-time kantitatif PCR yöntemi ile konfirme edilmiştir. *Acta1*, *Cyca*, *Tnni2* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10 ile Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Gruplarda gözlemlenen katlı değişimler Whole-transkriptom analizi ile elde edilen veriler ile uyumlu bulunmuştur. Elde edilen verilerin birbiriyle uyumlu olması, Whole-transkriptom analizinin verifikasyonu için seçilmiş genlere ait ekspresyon değişimlerinin real-time kantitatif PCR yöntemi ile doğrulandığını göstermektedir.



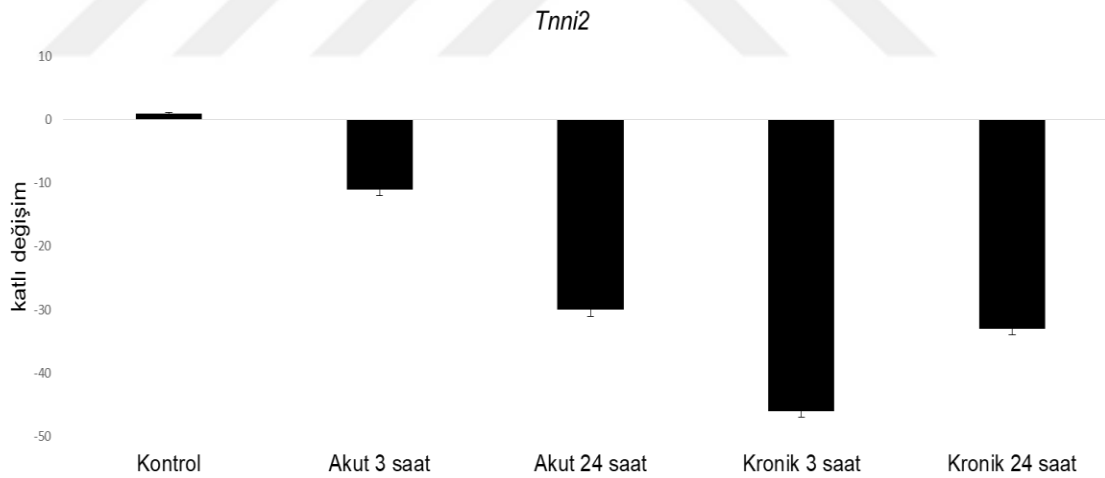
Şekil 4.9 Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi *Acta1* geni mRNA ekspresyon düzeyleri Ortalama±SS.

Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi *Acta1* geni mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda katlı değişim değeri $1 \pm 0,093$, akut 3 saat grubunda katlı değişim değeri $1,78 \pm 0,758$, akut 24 saat grubunda katlı değişim değeri $-0,13 \pm 0,11$, kronik 3 saat grubunda katlı değişim değeri $-0,60 \pm 0,181$, kronik 24 saat grubunda katlı değişim değeri $0,77 \pm 0,165$ 'dir.



Şekil 4.10 Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi *Cybs* geni mRNA ekspresyon düzeyleri Ortalama±SS.

Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi *Cybs* geni mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda katlı değişim değeri $1\pm 0,18$, akut 3 saat grubunda katlı değişim değeri $-28\pm 0,24$, akut 24 saat grubunda katlı değişim değeri $-27\pm 0,17$, kronik 3 saat grubunda katlı değişim değeri $-52\pm 0,18$, kronik 24 saat grubunda katlı değişim değeri $-32\pm 0,1$ 'dir.

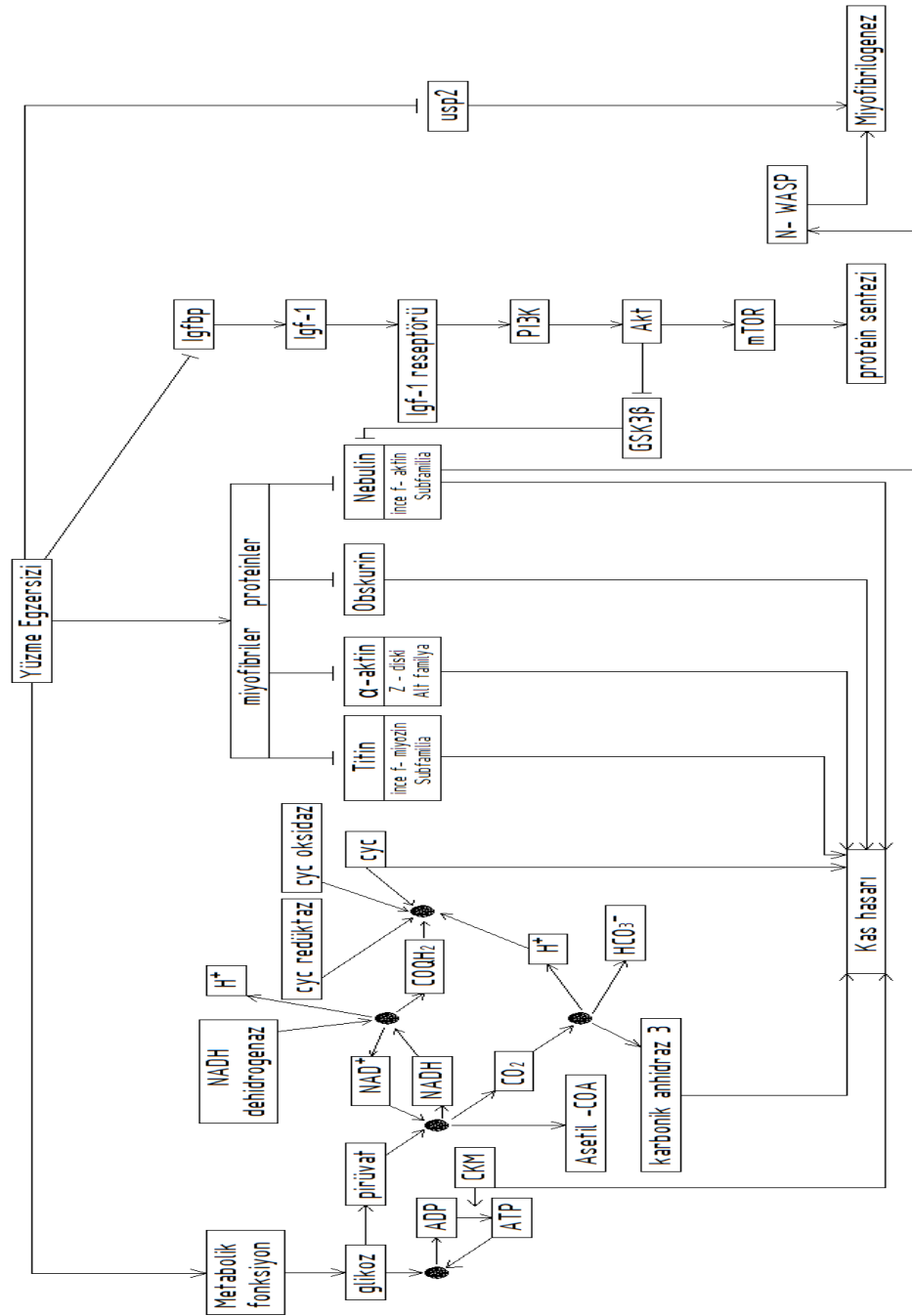


4.11 Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi *Tnni2* geni mRNA ekspresyon düzeyleri Ortalama±SS.

Grupların Gastrocnemius-soleus kas kompleksi *Tnni2* geni mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda katlı değişim değeri $1\pm 0,18$, akut 3 saat grubunda katlı değişim değeri $-11\pm 1,96$, akut 24 saat grubunda katlı değişim değeri $-30\pm 0,45$, kronik 3 saat grubunda katlı değişim değeri $-46\pm 0,8$, kronik 24 saat grubunda katlı değişim değeri $-33\pm 0,57$ 'dir.

4.5. Hedef sinyal iletim yolağı çizimi:

Mikroarray analizleri sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda uygulanan egzersiz protokolüne cevap olarak ifadeleri değişen mRNA'lara dayalı olarak hedef sinyal iletim yolları çizilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Uygulanan yüzme egzersizi protokolününü takiben 3 saat ve 24 saatte alınan örneklerde egzersize cevap olarak ifadeleri değişen genler ve hedef sinyal iletim yolları

5. TARTIŞMA

Mevcut çalışma kapsamında farelerde uygulanan akut ve uzun süreli yüzme egzersizlerini takiben m. gastrocnemius-soleus kas kompleksi hasar ve rejenerasyonu iki farklı zaman diliminde (3 saat ve 24 saat) incelenmiştir. Egzersizin protein turnoverını artırarak iskelet kasında onarım ve yeniden şekillenmeyi sağlayabileceği ileri sürülmektedir (Waskiw-Ford vd 2018). Verilerimiz hem kısa süreli, hem de kronik yüzme egzersizinin erken ve geç dönemde alınan örneklerde kas hasarına sebep olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, 6 haftalık yüzmeyi takiben 24 saat sonra alınan kas örneklerinde tespit edilen dejenerasyon en alt seviyededir. Kas rejenerasyonunun göstergesi olarak ele alınan merkezi yerleşimli çekirdeklere sahip kas lifleri tüm egzersiz gruplarında çok az sayıda gözlenmiştir. Whole-transkriptom analizi sonucunda tüm egzersiz gruplarında *Car3*, *Neb*, *Obscn*, *Ttn*, *Igfbp5*, *Igfbp7*, *Gsk3 β* ve *Usp 2* genlerinin kontrole göre down-regüle olduğu gözlenmiştir. Ek olarak kronik 3 saat grubunda *Acta1*, *Ckm*, *Tnni2* ve kronik 24 saat grubunda *Acta1* genleri kontrol grubuna göre önemli düzeyde down-regüle olmuştur. En dramatik down-regülasyon kronik 3 saat grubu, kontrol grubuna göre kıyaslandığında *Acta1* geninde gerçekleşmiştir (-128 kat). Egzersiz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında akut yüzme 3 saat grubunda; *Ckm*, *Acta1*, *Tnni2* ve *Tnnt3* genlerinin kronik yüzme 3 saat grubuna göre upregüle olduğu tespit edilmiştir. Akut yüzme 24 saat grubunda, akut yüzme 3 saat ve kronik yüzme 24 saat grubuna göre *Cyc'nin* (6 kat) upregüle olduğu izlenmiştir. Kronik yüzme 24 saat grubunda, kronik yüzme 3 saat grubuna göre *Ndufb9* geni upregüle olmuştur. Whole-transkriptom analizinde en dramatik ekspresyon değişimlerini gözlemlediğimiz *Acta1*, *Cyca*, *Tnni2* genleri mRNA ekspresyon düzeyleri β -*aktin* geni mRNA düzeyine göre real-time kantitatif PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda uygulanan egzersiz protokolüne cevap olarak ifadeleri değişen sinyal iletim yolları Şekil 4.11'de gösterilmektedir.

Literatürde farklı egzersiz türlerine cevap olarak meydana gelen kas hasar ve rejenerasyonunu inceleyen çalışmalar mevcuttur. (Boppart vd 2013, Boppart vd 2015). Hem hayvan, hem de insan modellerinde eksantrik egzersizin kas hasarına sebep

olduğu gösterilmiştir (Crameri vd 2004, Schoenfeld 2010, Damas vd 2016). Hasar derecesinin egzersizin türü, inceleme için kullanılan kas grubu, kullanılan kas hasar belirteci (direk/indirek) ve egzersizi takiben inceleme süresi gibi faktörlere bağlı olduğu ifade edilmiştir (McCully ve Faulkner 1985, Smith vd 1997, Lovering ve Brooks 2013). En sık gözlenen hasar belirteçlerinden biri Z-bantlarındaki dalgalanmalardır (Raastad vd 2010, Paulsen vd 2012). İskelet kas hasarı dokuda birkaç makromolekülle sınırlı kalabileceği gibi, sarkolemma, bazal lamina ve bağ dokuda büyük yırtıklara da sebep olabilir (Schoenfeld 2010). Kasın uzamasına gereksinim gösteren eksantrik egzersizlerin konsantrik ve izometrik kasılmalarla kıyaslandığında daha fazla kas hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (McHugh vd 2000). Özellikle direnç egzersizi veya yokuş aşağı koşular gibi ağır eksantrik yüklenmeler içeren akut egzersizlerin kaslarda birkaç gün boyunca devam edebilen protein hasarı, ağrı ve işlev bozukluğuna sebep olabildiği gösterilmiştir. Z-çizgileri ve sarkomer bozulmaları egzersizi takiben 1 ve 3. günler arasında en üst seviyeye ulaşmakla beraber, 6-8 gün boyunca yüksek seyredebilmektedir (Clarkson vd 1992, Crameri vd 2004, Malm vd 2004, Yu vd 2004). Öte yandan, direnç egzersizinin uzun süreli tekrarlanması kas hasar derecesinin azalması, yeniden şekillenme/dokuların güçlenmesi ve kas hipertrofisine yol açan cevapların uyarılması gibi olumlu adaptasyonlara sebep olabilir (Chen vd 2009; Damas vd 2016, Tang vd 2008). Çalışmamız kapsamında kas hipertrofisi incelenmemiştir.

Etkin yeniden şekillenme, dokunun korunması ve egzersizi takiben yararlı adaptasyonların ortaya çıkabilmesi için iskelet kası tamiri şarttır. Öte yandan kas doku yapısı ve işlevinin idamesi için gerekli tamir sürecinin kas hasarı tarafından tetiklenebildiği de ileri sürülmektedir (Sambasivan vd 2011). Rejenerasyonun temelini immün hücrelerin toplanması ve uydu hücre aktivasyonu gibi bir seri olay oluşturmaktadır. Bununla beraber egzersize cevaben kas hasarı-yeniden şekillenmesi gibi aslında iç içe geçmiş ve biri diğerine gereksinim gösteriyor gibi görünen olayları düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Hasara cevap olarak kas rejenerasyonunu içeren literatürde yaygın olarak kabul gören olaylar serisinde inflamatuvar yanıt önemli rol oynar (Boppart vd 2013). Bu model, dokuda yer alan makrofajların aktivasyonu, nötrofil toplanması (1-2 saat), makrofaj infiltrasyonu (12-24 saat) ve kastaki primer progenitor hücrelerin çoğalma ve aktivasyonlarını (1-8 gün) içermektedir (Saclier vd 2013). Orta derecede kas hasarı oluşturan dayanıklılık egzersizini (bisiklet binme ve koşu) takiben iskelet kası transkriptomunda zamana bağlı meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir çalışmada, egzersizi takiben 3. saatte kasta erken lökosit göçü ve immün aktivasyon tespit edilmiştir (Neubauer vd 2014). Lökosit infiltrasyonu, immün yanıtla ilişkili sinyallerin ortaya çıkması ve adaptif yeniden

şekillenmeyi içeren transkripsiyonal aktivitenin ise egzersizi takiben 96. saate kadar gerçekleştiği gözlenmiştir (Neubauer vd 2013). Bu veriler kas hasarı oluşturan dayanıklılık egzersizini takiben ilk 96 saat içinde kas toparlanmasının henüz tamamlanamadığını göstermektedir.

Literatürde yüzme egzersizini takiben olası kas hasar ve rejenerasyonunu inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim verilerimiz yukarıda özetlenen çalışmaların verileriyle uyumlu olarak tüm egzersiz gruplarında m. gastrocnemius-soleus kas kompleksinde lif bütünlüğünün kaybolduğunu, kas liflerinde yer yer açılma ve ayrılmaların; dalgalanmaların olduğunu göstermiştir. Bazı kas liflerinde çizgilenmeler bozulmuş ve belirgin mono ve polinükleer hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir. Bununla beraber histolojik görüntüleme sonucunda en belirgin kas hasarının akut yüzme egzersizi yapan grupta, egzersizden 3 saat sonra alınan kas örneklerinde ortaya çıktığını izlenmiştir. Zıt olarak, uzun süreli yüzmeyi takiben 24 saat sonra alınan doku örneklerinde diğer gruplara göre daha az dejeneratif görünüm izlenmiştir. Öte yandan deney gruplarımızda kas rejenerasyonunun göstergesi olan merkezi yerleşimli çekirdeklere sahip, küçük kas lifleri çok az sayıda tespit edilmiştir. Deney protokolümüzde örnekler egzersizleri takiben 3 ve 24. saatlerde alınmış olup; verilerimiz bu sürelerin kasta rejenerasyon gelişimi için yeterli olmadığını düşündürmektedir. Çalışmamız kapsamında egzersize cevap olarak meydana gelebilecek olası kas rejenerasyonunun daha net olarak tespitine olanak sağlayacak ileri immünohistokimyasal analizler yapılamamıştır.

Plazma/serum CK aktivitesi egzersiz, hastalıklar ve travmaya cevaben oluşan kas hücre nekrozu ve doku hasarının belirteci olarak ele alınmaktadır (Baird vd 2012). Yüksek şiddete uygulanan egzersizlerden sonra oksidatif strese bağlı olarak gelişen kas hasarında hücre zarı bütünlüğü bozularak sitozolik enzimlerden CK'nın serumda arttığı bilinmektedir (Tzu-Shao vd 2014). Farelerde 60 dk/gün, 4 hafta boyunca uygulanan yüzme egzersizi plazma CK aktivitesinde artışa sebep olmuştur (Xie vd 2019). Literatürde eksantrik ve konsantrik egzersizi takiben plazma CK düzeyini artmış bulan çalışmalar mevcut olmakla beraber, koşu bandında 70% VO_{2maks} uygulayan bir diğer çalışmada plazma CK miktarında değişim gözlemlenmemiştir (Sorichter vd 1997). Kan CK aktivitesinin eksantrik egzersizden 2 gün sonra arttığı, 4-5 gün sonra en üst seviyeye ulaştığı da gösterilmiştir (Hyldahl vd 2017). Mevcut çalışmada plazma CK aktivitesi ticari bir kit aracılığı ile ölçülmüş ve gruplar arası istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Bu durum örnek toplama zamanlarıyla ilişkili olabilir. Plazma CK aktivitesini egzersizden 3 ve 24 saat sonra aldığımız örneklerden ölçmüş

olduğumuzdan artışları yakalayamamış olabiliriz. Verilerimizin istatistiksel olarak önemli değişimler içermemesi kısmen standart sapmalarımızın yüksekliğine de bağlı olabilir. Öte yandan, kas hasar belirteçlerinin plazma ya da serumda ölçümlerinin her zaman kas hasar düzeyini kesin olarak yansıtmayabileceği de ileri sürülmektedir (Damas vd 2016). CK'nın kandan temizlenme mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ölçülen plazma/serum CK sadece kas hasarına bağlı salınan CK miktarını değil, salgılanan CK'nın enzim aktivite derecesi ve plazma/serumdan temizlenme hızını da yansıtmaktadır (Thompson vd 2006).

Çalışma kapsamında, akut ve uzun süreli yüzme egzersizlerini takiben m. Gastrocnemius-soleus kas komplekslerinden izole edilen RNA örneklerinden Whole-transkriptom analizi yapılmıştır. Çalışmamız yüzme egzersizini takiben gözlenen değişiklikleri Whole transkriptom analizi ile inceleyen literatürdeki ilk çalışmadır. Whole transkriptom analizi için kullanılan ticari chip fare genomundaki bilinen tüm genlerin ifade değişimlerini incelememize olanak sağladığından; analiz sonucunda çok sayıda genin ifadesinde katlı değişim saptanmıştır. Bunlardan bir kısmını da tanımlanmamış genler oluşturmaktadır. Akut 3 saat ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 8 gende up-regülasyon, 1764 gende down-regülasyon gözlemlenirken, akut 24 saat ile kontrol grubu karşılaştırılmasında 1 gende up-regülasyon, 1665 gende down-regülasyon izlenmiştir. Uzun süreli yüzme egzersizi yapan gruplarla kontrol grubu karşılaştırıldığında; kronik 3 saat grubunda kontrole göre 17 gende up-regülasyon, 1931 gende down-regülasyon gözlemlenmiştir. Kronik 24 saat grubunda ise kontrole göre 13 gende up-regülasyon, 1823 gende down-regülasyon gözlemlenmiştir. Burada istatistiksel olarak önemli bulunan ve en yüksek katlı değişim gösteren bulgular; özellikle tüm egzersiz gruplarında kontrole göre önemli düzeyde değişim gösterdiği tespit edilen genler tartışılacaktır. Ek olarak, kas hasarı ve rejenerasyonu ile ilgili olduğu bilinen genlere ağırlık verilecek ve alt başlıklar şeklinde ele alınacaktır.

Nebulin (Neb);

Kas kasılmasının düzenlenmesi, Z bantlarının oluşumu ve miyofibril organizasyonunu da içeren bir grup hücresel olayda rol oynayan nebulin, Z diskine bağlı ince filamentlere paralel seyreden ve aktin filamentlerinin uzunluklarının belirlenmesinde görev aldığı düşünülen bir proteindir (Chu vd 2016). Tek seferlik yüksek şiddetli eksenrik diz ekstensör direnç egzersizinden 24 saat sonra alınan m. vastus lateralis nebulin protein düzeyinde egzersiz öncesine göre %15'lik azalma tespit edilmiştir (Trappe vd 2002). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde tüm egzersiz gruplarında kontrol grubuna kıyasla *Neb*, geninde 45-69 katlık down-regülasyon

görülmüştür. Post-egzersiz *Neb* down-regülasyonunun nedeni henüz aydınlatılmamış olmakla beraber, direk hasar veya degradasyon sonucu ya da egzersize yanıt olarak farklı miyofibriler proteinlerin turn-over hızındaki bir değişim sonucu ortaya çıkmış olabileceği ileri sürülmektedir. Ek olarak, kas gerimine bağlı süreçlerin Z diskinden nebulin salınımına sebep olmuş olabileceği de ön görülmektedir (Trappe vd 2002).

Titin (Ttn);

Titin (konnektin) büyük elastik yapıda bir protein olup, çizgili kas sarkomerinde Z çizgisini M çizgisine bağlar. Pasif güç oluşturucu olarak işlev görmesine ek olarak, miyofibrilogenез sırasında sarkomer proteinlerinin düzenlenmesinde moleküler bir cetvel olarak görev aldığı ileri sürülmektedir (Udaka vd 2008). Egzersize cevap olarak kas titin değişimi ile ilgili çelişkili literatür bilgileri mevcuttur. Titin miktarının egzersiz tipi, şiddet ve süresi ile egzersiz sonu örnek toplama zamanından önemli oranda etkilendiği bilinmektedir (Krüger ve Kötter 2016). 20 gün boyunca gün aşırı eksantrik direnç egzersizi uygulanan gruplarda son egzersizden 12 saat sonra alınan m. gastrocnemius kas örneklerinde titin protein düzeyinin değişmediği gösterilmiştir (Ochi vd 2007). Bir diğer çalışmada, submaksimal düzeyde tüketici egzersizi takiben 3 saat sonra titin gibi gerim-duyarlı proteinlerin aktive olduğu bulunmuştur (Koskinen vd 2017). Maksimal şiddette sıçrama egzersizinden 3 saat ve 2 gün sonra alınan kas biyopsi örneklerinde PCR ile *ttn* ekspresyon düzeyinin değişmediği gösterilmekle beraber, kronik orta şiddette koşu egzersizinin kas titin ifadesinde artışa sebep olduğunu gösteren çalışma da mevcuttur (Koskinen vd 2017). Bizim çalışmamızda tüm egzersiz gruplarında kontrole göre titin geninde yaklaşık 30 katlık down-regülasyon gözlenmiştir. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, Trappe ve arkadaşları da tek seferlik yüksek şiddetli eksantrik diz ekstensör direnç egzersizinden 24 saat sonra alınan m. vastus lateralis titin protein düzeyinde egzersiz öncesine göre %30'luk azalma tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu bulgunun olasılıkla lif hasarına cevap olarak sarkomerik protein turn-overında artışa işaret ettiğini ileri sürmüşlerdir (Trappe vd 2002). Egzersiz ile tetiklenen doku hasarına cevap olarak, titin olasılıkla sarkomerdeki yerinden ayrılır, parçalanır ve adaptif sinyallerde önemli basamaklara aracılık eder.

Karbonik anhidraz 3 (Car3);

İskelet kasında yer alıp, miyokarda bulunmadığından ve hasarı takiben dolaşıma salındığından iskelet kası hasarının önemli bir belirtecidir (Fu vd 2009). Literatürde egzersize cevaben kas CA3 protein değişimi ile ilgili de çelişkili veriler vardır. Tek seferlik 21 km koşu egzersizini takiben 24. saatlerde alınan kan örneklerinde CA3 proteininde 2,9 katlık artış tespit edilmiştir (Lippi vd 2008). 30 dk/gün,

30 gün süresince düşük şiddette koşu egzersizi uygulanmış, quadriceps kasından örnek alınmış ve western blot yöntemiyle CA3 protein düzeyinin değişmediği gözlenmiştir (Fontana vd 2015). 30 dakikalık intermittan yokuş yukarı ve aşağı koşu egzersizlerinden 2-12 saat sonra alınan kan örneklerinde CA3 düzeyinin arttığı, 48 saat sonra ise kontrol seviyesinin altına düştüğü tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda akut ve kronik yüzme egzersizlerini takiben m. gastrocnemius-soleus kas kompleksi *car3* gen ifadesinde 50-60 katlık down-regülasyon gözlenmiştir. Farklı egzersiz protokolleri içermelerine rağmen, son iki çalışma verileri beraber değerlendirildiğinde, kan CA3 seviyesinin artışı ile eş zamanlı olarak kas *Car3* geninin down-regüle olduğu ifade edilebilir.

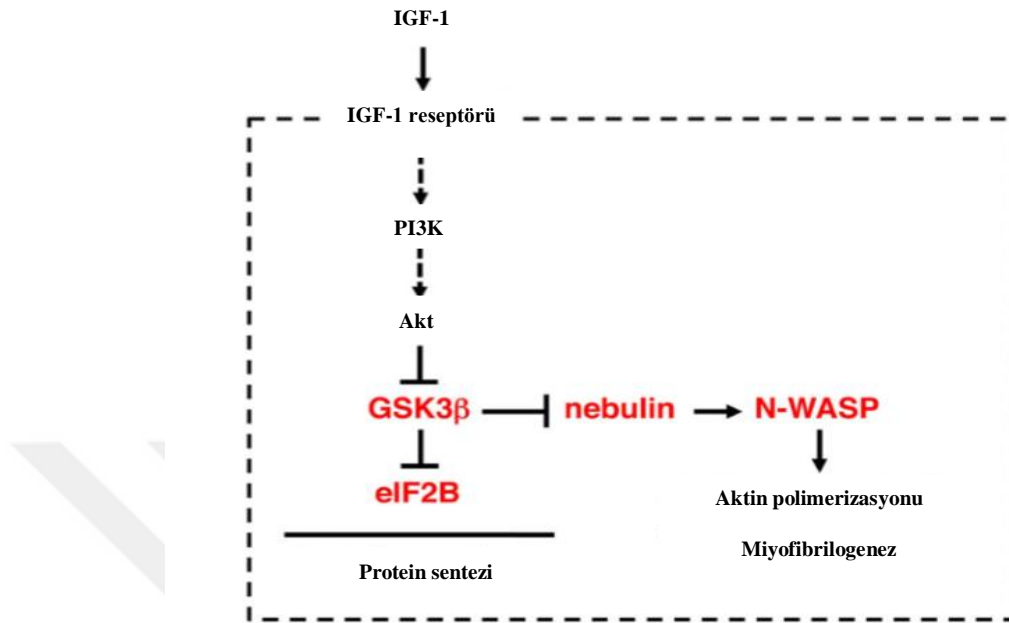
Obskurin (Obscn);

Son yıllarda üzerinde durulan önemli bir kas proteini de obskurindir (Borisov vd 2006). Periferel miyofibriler M bantlarını sarkolemma ile ilişkilendirir. Egzersize yanıt olarak miyofibril yeniden şekillenmesinde hücre iskeleti olarak rol oynar (Randazzo vd 2017). Miyofibrilogenез, farklı proteinlerin işlevsel sarkomeri oluşturmak üzere bir araya gelip organize olmasını içeren karmaşık bir süreçtir (Sanger vd 2002). Obskurin, miyofibrilogenез sırasında yapısal bütünlük, miyofibril organizasyonu ve dayanıklılığını sağlamayı da içeren farklı basamaklarda görev alır. Miyozin gibi diğer kasıcı proteinlerin uygun şekilde konumlandırılmasını sağladığı ileri sürülmektedir (Kontrogianni-Konstantopoulos vd 2009, Potts vd 2017). Carlsson ve arkadaşları tek bir eksenrik egzersiz seansından 1 saat, 2-3 gün, 7-8 gün sonra m. soleus biyopsisinde sarkomerogenезle ilişkili bulgular tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, immünohistokimyasal analizler sonucunda obskurinin azalmadığını ancak M bandı seviyesinde korunduğunu ya da sarkomer üzerine difüze olduğunu ve A bantlarının oluşumu ve devamında önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (Carlsson vd 2008). Yukarıdaki savı destekler şekilde, bizim çalışmamızda da tüm egzersiz gruplarında 3 ve 24. saatte kas *Obscn* geninde kontrole göre yaklaşık 3 katlık down-regülasyonlar izlenmiştir.

İnsülin benzeri büyüme faktörleri bağlayıcı protein 5 ve 7 (Igfbp 5 ve 7);

Verilerimiz *Igfbp 5*'in tüm egzersiz gruplarında kontrole göre 3 kat, *Igfbp 7*'nin ise 2 kat down-regüle olduğunu göstermektedir. *Igfbp*'ler, IGF1'in IGF-1 reseptörüne bağlanmasını inhibe ederler (Delafontaine vd 2004). Şekil 5.1'de gösterilen mekanizmalara göre uyguladığımız egzersiz protokollerine yanıt olarak *Igfbp 5* ve *7*'nin azalmasının, IGF1'in reseptörüne bağlanarak PI3K yolağı üzerinden Akt'yi ve dolayısıyla nebulini baskılamasına ve aktin polimerizasyonu aracılığıyla miyofibrilogenезe yol açacağı ileri sürülebilir (Şekil 5.1) (Schiaffino ve Mammucari

2011). Uyguladığımız yüzme egzersizlerinin *Neb* geninde down-regülasyona sebep olması da bu savı destekleyici niteliktedir.



Şekil 5.1 IGF-Akt yolağı(Schiaffino ve Mammucari 2011)

Bizim verilerimizle uyumlu olarak, tek seans bacak egzersizini takiben *Igfbp 5* ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Dennis vd 2008). Öte yandan, Moore ve arkadaşları tek seferlik ekstremite direnç egzersizini takiben 3, 24, 48. saatlerde m. vastus lateralis *Igfbp 5* mRNA düzeylerinde değişiklik olmadığını bulmuşlardır (Moore vd 2018). *Igfbp 7* ile ilgili literatürde tek bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, askerlere 23 gün boyunca yaptırılan ileri askeri antrenmanın post-egzersiz 72. saatte kan *Igfbp 7* konsantrasyonunu değiştirmedeği gözlenmiştir (Redd vd 2017).

Glikojen sentaz kinaz 3 β (*Gsk3β*);

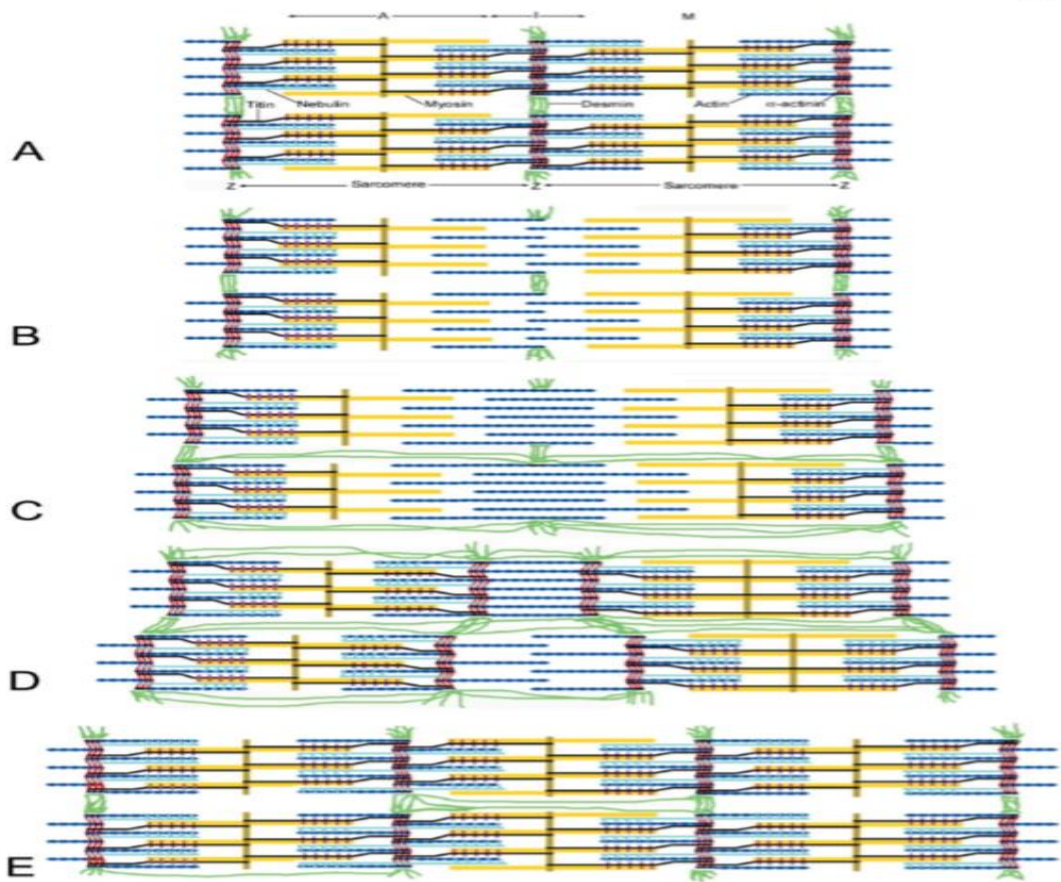
Gsk3β glikojen metabolizması ve protein turn overında düzenleyici olarak görev alır (Cohen ve Frame 2001). Çok yakın zamanda Theeuwes ve arkadaşları Şekil 5.1 ile uyumlu olarak gastrocnemius kasında *Gsk3β* proteininin inhibisyonunun miyojenik farklılaşma ile ilişkisini göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca *Gsk3β* proteininin baskılanmasının hücresel oksijen tüketimi arttırdığını da ifade etmişlerdir (Theeuwes vd 2018). Bizim bulgularımız tüm egzersiz gruplarında *Gsk3β*'nin kontrole göre yaklaşık 2 kat down regüle olduğunu göstermektedir. Şekil 5.1 incelendiğinde, yukarıda *Neb* ve *Igfbp*'ler ile ilgili tartışmalar hatırlandığında uygulanan yüzme egzersizlerinin birkaç genin ekspresyonunu birlikte etkileyerek miyofibrillogenezi uyardığı ileri sürülebilir.

Aktin, Alfa 1 (Acta1);

Acta1 ile kodlanan iskelet kası α -aktin erişkin iskelet kasının en baskın aktin izoformudur. İskelet kasında α -aktin'den polimerize olan F-aktin tropomiyozin, troponin, nebulin ve Z çizgisinin prekürsörü olan α -aktinin ile etkileşim içindedir (Laing vd 2009). Tek seferlik eksantrik egzersizden 1 saat sonra alınan m. soleus kas biyopsilerinde α -aktinin, titin ve nebulin protein seviyelerinin değişmediği, ancak 2 gün sonra arttığı ve 9. güne kadar yüksek seyrettiği gösterilmiştir. Araştırmacılar bu proteinlerden hiç birinin Z çizgisinin bir parçası olarak bulunmadığını, miyofibrillerdeki artmış sarkomer sayısı içeren alanlarda yer aldıklarını gözlemlemişlerdir. Bu veriler ışığında α -aktinin, titin ve nebulinin eksantrik egzersize yanıt olarak yeni sarkomer oluşumunu içeren miyofibril yeniden şekillenmesinde rol oynuyor olabildiklerini ileri sürmüşlerdir (Yu vd 2003). Bizim çalışmamızda kronik yüzme egzersizini takiben 3. ve 24. saatte alınan kas örneklerinde *Acta1* geninin kontrole göre sırasıyla 128 ve 19 kat down-regüle olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, akut egzersizi takiben 3. saatte alınan örneklerde *Acta1*'in kronik 3 saat grubuna göre 34 kat up-regüle olduğu gözlenmiştir. Bizim örnek toplama zamanımız Yu ve Dieter'in çalışmasındaki örnek toplama aralığında yer almakla beraber, bire bir uyuşmamaktadır. Egzersiz tipleri de farklıdır. Bununla beraber iki çalışma verileri beraber değerlendirildiğinde *Acta1* ve α -aktinindeki değişimlerin egzersizi takiben 3-24 saat aralığında kas hasarı, 2-9. günlerde ise rejenerasyona bağlı olarak geliştiği speküle edilebilir. Hem insan hem de hayvan çalışmalarında iskelet kası hasarını takiben dolaşıma α -aktin salınımı olduğu gösterilmiştir (Martinez-Amat vd 2005, Martinez-Amat vd 2007). Klein ve arkadaşları intakt *Acta1*'in azalmasının olaslıkla sarkomerin mekanik parçalanmasına bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Klein vd 2014). Benzer şekilde, Fuchs ve arkadaşları da kasın kontraktıl kitlesinin kaybı ile *Acta1* gen ifadesi değişimi arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (Fuchs vd 2008). Bu veriler, yukarıdaki spekülasyonu destekler niteliktedir.

Egzersiz takiben miyofibrillerin hasar ve yeniden şekillenmesi basamakları literatürde yaygın olarak çalışılmaktadır. Bu basamaklar Yu ve arkadaşları tarafından çizilen Şekil 5.2'de şu şekilde ifade edilmektedir (Yu vd 2003): A; normal sarkomer yapısını göstermektedir. İleri sürülen mekanizmaya göre; egzersize bağlı kas hasarı sarkomerde α -aktinin, titin ve nebulin proteinlerinin kaybına yol açar (Şekil 5.2 B). Miyofibriler lezyonlar lokal olarak aktin filamentlerinin uzamasına neden olur. α -aktinin, titin, nebulin gibi proteinlerin lokal kayıpları sitoplazmik havuzlarda G-aktin işlevi ve aktin filamentlerinin fokal büyümesini kolaylaştırabilir (Şekil 5.2 C). Aktin filamentlerinin uzaması yeni sarkomer oluşumu ve α -aktinin, titin ve nebulin proteinlerinin

reintegrasyonuna yol açar. Aktin ve desmin filamentleri olasılıkla bu yeniden oluşum için mekanik ve yapısal bir çatı oluşturmakta, α -aktinin ve titin ve daha sonra da nebulin bu sarkomerik oluşuma katılmaktadır (Şekil 5.2 D). Son basamak sarkomerogenezin tamamlanmasıdır (Şekil 5.2 E). Bu bilgiler, bizim verilerimizle birlikte değerlendirildiğinde yaptığımız egzersizlere cevap olarak örnek toplama zamanımızın şekilde "B" ile ifade edilen zaman dilimine karşılık geldiği ifade edilebilir. Bu durum, histolojik incelemelerde kas hasarı gözlenip, henüz rejenerasyona bağlı yeterli bulgu elde edemeyişimizi de açıklamaktadır.



Şekil 5.2. Egzersiz ile oluşan kas hasarını takiben miyofibrillerin yeniden şekillenmesi basamakları (Yu vd 2003)

Ubiquitin spesifik proteaz 2 (Usp2);

Usp ailesinin bir üyesi olup, özellikle testisler ve iskelet kaslarında bol miktarda eksprese olduğu gösterilmiştir (Kitamura vd 2013). Farklı dokularda sitokin üretimini, glikoz ve lipid metabolizmasını düzenlemek gibi görevleri vardır (Zhang vd 2014, Kitamura vd 2017). Net olamamakla beraber, mitokondrileri aktive ederek miyoblast çoğalması ve miyotüplere farklılaşmada rol oynadığı düşünülmektedir (Hashimoto vd 2019). Çalışmamızda *Usp2*'nin tüm egzersiz gruplarında kontrole göre yaklaşık 3 kat

down regüle olduğu izlenmiştir. Bu veriler egzersizleri takiben alınan örneklerde miyoblast proliferasyon ve farklılaşma aşamasına henüz gelinmediği savını destekler niteliktedir.

Troponin T3 (Tnnt3);

Kas kasılması ve dayanıklılığını düzenleyen sağlıklı ve hasta bireylerde iskelet kası yapı-fonksiyon ilişkisinin önemli moleküler belirteçlerindedir (Schilder vd 2011). Literatürdeki egzersize yanıt olarak *Tnnt3* düzeyini inceleyen tek çalışmada; 8 set 10 tekrarlı bilateral bacak ekstansiyonu protokolünden 24 saat sonra alınan m. vastus lateralis örneklerinde *Tnnt3* gen ifadesinin değişmediği saptanmıştır (Coble vd 2015). Çalışmamız kapsamında ise, akut 3 saat grubunda *Tnnt3* ekspresyonunun kronik 3 saat grubuna göre 20 kat upregüle olduğu gösterilmiştir.

Troponin I (Tnni2);

Tnni2 hızlı kasılma liflerin ince filamentlerinde troponin kompleksinin inhibitör alt ünitesi olup, kasın kasılma ve gevşeme sürecinde Ca^{+2} düzenlenmesinde anahtar rol oynar (Seng ve Jin 2016). İskelet kası hasar belirteçidir (Moshiri vd 2016). Mevcut tez kapsamında kronik 3 saat grubunda *Tnni2* gen ifadesinin, kontrole göre 24 kat down-regüle olduğu; akut 3 saat grubunda ise kronik 3 saat grubuna göre 14 kat up-regüle olduğu gösterilmiştir.

Kas Kreatin kinazı (Ckm);

CKM sarkomerde yer alan miyofibriler M çizgisine özgül olarak bağlanan sitozolik bir enzimdir. İskelet kasında miyogenez ve hasar belirteçidir (Brancaccio vd 2007). Verilerimiz *Ckm* gen ifadesinin kronik 3 saat grubunda, kontrole göre 53 kat down-regüle olduğunu, akut 3 saat grubunda ise kronik 3 saat grubuna göre 17 kat up-regüle olduğunu göstermektedir. Kas hasar belirteçleri *Tnni2* ve *Ckm* gen ifadelerindeki değişim beraber değerlendirildiğinde birbiri ile çok benzer yönde değişimler izlendiği görülmektedir. Bu sonuçlar, histolojik incelemeler sonucu gözlemlenen akut 3 saat grubundaki dikkat çekici düzeydeki kas hasarı ile de uyumludur. Literatürde tek seferlik eksantrik egzersize cevaben serum 1-4. günlerde TnnI ve CK düzeylerinin arttığı, 14. günde bazal değere indiği tespit edilmiştir (Chapman vd 2013). Bir başka çalışmada da egzersizi takiben tek seferlik eksantrik, konsantrik ve 20 dk yokuş aşağı koşu egzersizlerini takiben 6 ve 24. saatte plazma TnnI ve CK düzeyleri yüksek bulunurken, 20 dk %0 eğimlik treadmill koşu egzersizini takiben her iki belirtecin düzeylerinin değişmediği izlenmiştir. Bu çelişkili veriler, kan değerleri olup gen ekspresyon değişimleri değildir.

Ek olarak, *Acta1* ve *Ckm*'nin miyojenik farklılaşma sürecinde miyotüplerden eksprese edildikleri gösterilmiştir (You-Na ve Eun-Joo 2013). Çalışmamız kapsamında egzersiz gruplarında *Acta1* ve *Ckm* down regülasyonu, *Usp 2* down regülasyonu ile uyumlu olarak post-egzersiz örnek alma zamanının henüz miyojenik farklılaşma aşamasına gelinmeden yapıldığının göstergesi olabilirler.

Sitokrom C somatik (Cycs);

Bu gen mitokondriyal elektron transport zincirinin merkezi bileşeni olarak görev yapan küçük bir hem proteinini kodlar. Kodlanan protein (cyc) mitokondri iç membranında olup, elektron alıcısı olarak görev yapar ve sitokrom B'den sitokrom c oksidaz kompleksine elektron transferi yapar (Tafari ve Farber 2002). Sitokrom c oksidaz eksikliğinde mitokondriyal disfonksiyon ve buna bağlı olarak endurans egzersizinde performans eksikliği gösterilmiştir (Samelman 2000). Salınan cyc miktarının mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve apoptoz göstergesi olduğu bilinmektedir (Skulachev 1998). Luo ve arkadaşları kronik direnç egzersizinde mitokondriden sitozole salınan cyc miktarının azaldığını göstermiş ve uzun süreli egzersizin mitokondri bağımlı apoptozu baskıladığını ileri sürmüşlerdir (Luo vd 2013). Bizim çalışma bulgularımız da benzer şekilde kronik 24 saat grubunda Cycs'nin akut 24 saat grubuna göre down regüle olduğunu göstermektedir. Histolojik verilerimiz doğrultusunda kronik 24 saat grubunun en az dejeneratif görünüme sahip bulgular içerdiği göz önüne alındığında uzun süreli yüzme egzersizinin apoptozun baskılanmasıyla ilişkili olabileceği düşünülebilir. Öte yandan verilerimiz akut 24 saat grubunda Cycs upregülasyonu varlığını göstermiştir; ancak histolojik bulgularımıza göre en belirgin kas hasarı akut 3 saat grubunda gözlenmiştir. Bu veriler hasarı takiben apoptozla ilişkili olabilecek Cycs upregülasyonu için belli bir süre geçmesi gerektiği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmaya dahil edilen gruplara ait m. gastrocnemius-soleus kas kompleksi örneklerinde Whole-transkriptom analizinde en dramatik ekspresyon değişimlerinin gözlemlendiği *Acta1*, *Cycs*, *Tnni2* genleri mRNA ifade düzeyleri β -aktin geni mRNA düzeyine göre real-time kantitatif PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Çalışmanın tüm verileri birleştirilerek uygulanan egzersiz protokollerine cevap olarak ifadeleri değişen genlere ait sinyal iletim yolları çizilmiş ve Şekil 4.12'de paylaşılmıştır. Verilerimiz beraber değerlendirildiğinde akut ve 6 haftalık yüzme egzersizinin m. gastrocnemius-soleus kas kompleksinde kas hasarına sebep olabileceği ve miyofibrilogenezi uyardığı gözlenmiştir. Kas örnekleri son egzersiz seansını takiben 3 ve 24. saatlerde alınmış;

ancak bu süreler belirgin rejenerasyon gözlenmesi için yeterli olamamıştır. Konunun aydınlatılması için farklı tip/şiddet/sıklık/süredeki egzersiz protokollerini takiben daha uzun süreli örneklem takipleri içeren deney protokolleri hazırlanmasına gereksinim vardır.



6. SONUÇLAR

- 1) Histolojik bulgular akut 3 saat, akut 24 saat ve kronik 3 saat gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kas hasarı olduğunu göstermektedir. Kronik 24 saat grubunda da kas hasarı gözlenmiş olup, istatistiksel olarak önemli düzeyde değildir.
- 2) Histolojik olarak belirgin kas rejenerasyonu tespit edilmemiştir.
- 3) Plazma CK aktivitesinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmamıştır.
- 4) Whole transkriptom analizi sonuçlarına göre tüm egzersiz gruplarında *Car3*, *Neb*, *Obecn*, *Ttn*, *Igfbp5* ve *Igfbp7* *Gsk3 β* ve *Usp2* genlerinin kontrole göre down-regüle olduğu tespit edilmiştir.
- 5) Kronik 3 saat grubunda *Acta1*, *Ckm*, *Tnni2* ve kronik 24 saat grubunda *Acta1* genleri kontrol grubuna göre önemli düzeyde down-regüle olmuştur.
- 6) En dramatik down-regülasyon kronik 3 saat grubu, kontrol grubuna göre kıyaslandığında *Acta1* geninde gerçekleşmiştir (-128 kat).
- 7) Egzersiz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında akut yüzme 3 saat grubunda; *Ckm*, *Acta1*, *Tnni2* ve *Tnnt3* genlerinin kronik yüzme 3 saat grubuna göre upregüle olduğu tespit edilmiştir. Akut yüzme 24 saat grubunda, akut yüzme 3 saat ve kronik yüzme 24 saat grubuna göre *Cyc*'nin (6 kat) upregüle olduğu izlenmiştir. Kronik yüzme 24 saat grubunda, kronik yüzme 3 saat grubuna göre *Ndufb9* geni upregüle olmuştur.
- 8) Whole-transkriptom analizi verileri real-time kantitatif PCR yöntemi ile doğrulanmıştır.

Tüm veriler beraber değerlendirildiğinde akut ve uzun süreli yüzme egzersizinin m. gastrocnemius-soleus kas kompleksinde akut 3 saat grubunda daha fazla olmak üzere kas hasarına sebep olduğu ve miyofibrilogenezi uyardığı ileri sürülebilir. Kronik yüzme egzersizinden 24 saat sonra hasarın azaldığı gözlenmiştir. Örnekler egzersizleri takiben 3 ve 24. saatlerde alınmış; ancak bu süreler miyofibrilogenez gelişimi için yeterli olmamıştır.

7. KAYNAKLAR

Adamu B, Sani MU, Abdu A. Physical exercise and health: a review. *Niger J Med* 2006; 15(3):190-196.

Armani A, Galli S, Giacomello E, Bagnato P, Barone V, Rossi D, Sorrentino V.. Molecular interactions with obscurin are involved in the localization of muscle-specific small ankyrin1 isoforms to subcompartments of the sarcoplasmic reticulum. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3546–3558.

Armstrong L, Balady GJ, Berry MJ, Davis SE, Davy BM, Davy KP, Franklin BA, Gordon NF. “Exercise prescription modifications for cardiac patients”, Eds. Whaley MH, Brubaker PH, Otto RM, *ACSM’s guidelines for exercise testing and prescription Seventh Edition*, USA, 2006, s.205-215.

Arshadi S, Bakhtiyari S, Haghani K, Valizadeh A. Effects of Fenugreek Seed Extract and Swimming Endurance Training on Plasma Glucose and Cardiac Antioxidant Enzymes Activity in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Osong Public Health Res Perspect* 2015; 6(2): 87-93.

Bagnato P, Barone V, Giacomello E, Rossi D, Sorrentino V. Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J Cell Biol* 2003; 160: 245–253.

Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff GF. Creatine-Kinase- and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery. *J Nutr Metab* 2012; 2012: 960363.

Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitás K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC, Labeit S. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol* 2001; 153: 413-428.

Baoge L, Van Den Steen E, Rimbaut S, Philips N, Witvrouw E, Almqvist KF. Treatment of skeletal muscle injury: a review. *ISRN Orthop* 2012; 68: 90-112.

Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR. Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* 1996;60(1): 47-57.

Bazgir B, Asgari A. The interactive role of exercise and satellite cells in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *The scientific and medical journal of Ebnesina* 2015; 16(4): 47–63.

Bazgir B, Rouhollah F, Mojtaba RV, Paul M, Asgari A. Satellite Cells Contribution to Exercise Mediated Muscle Hypertrophy and Repair. *Cell J* 2017; 18(4): 473–484.

- Beam KG, Bannister RA. Looking for answers to EC coupling's persistent questions. *Journal of General Physiology* 2010; 136: 7-12.
- Beigneux AP, Kosinski C, Gavino B, Horton JD, Skarnes WC, Young SG. ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *J Biol Chem* 2004; 279: 9557-9564.
- Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9: 227-237.
- Bellafiore M, Cappello F, Palumbo D, Macaluso F, Bianco A, Palma A. Increased expression of titin in mouse gastrocnemius muscle in response to an endurance-training program. *Eur J Histochem* 2007; 51: 119–124.
- Bellamy LM, Joannis S, Grubb A, Mitchel ICJ, McKay BR, Phillips SM, Baker S, Parise G. The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. *PLoS One* 2014; 9: e109739.
- Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 2001; 81: 1353–1392.
- Bennett V, Healy J. Membrane domains based on ankyrin and spectrin associated with cell-cell interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a003012.
- Bes TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2000; 11: 251-266.
- Beuerle JR, Azzazy HM, Styba G, Duh SH, Christenson RH. Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 115–128.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; 376 (6543): 768-771.
- Boppart MD, De Lisio M, Zou K, Huntsman HD. Defining a role for non-satellite stem cells in the regulation of muscle repair following exercise. *Front Physiol* 2013; 5 (4): 310.
- Boppart MD, De Lisio M, Witkowski S. Exercise and Stem Cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 135: 23-56.
- Borisov AB, Sutter SB, Kontogianni-Konstantopoulos A, Bloch RJ, Westfall MV, Russell MW. Essential role of obscurin in cardiac myofibrillogenesis and hypertrophic response: evidence from small interfering RNA-mediated gene silencing. *Histochem Cell Biol* 2006; 125(3): 227-238.
- Borycki AG, Li J, Jin F, Emerson CP, Epstein JA. Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development* 1999; 126: 1665–1674.
- Borzok MA, Catino DH, Nicholson JD, Kontogianni-Konstantopoulos A, Bloch RJ. Mapping the binding site on small ankyrin 1 for obscurin. *J Biol Chem* 2007; 282: 32384–32396.

Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJM. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. **The Journal of Physiology** 1994; 481(3): 663–675.

Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **Br Med Bull** 2007; 81–82: 209–230.

Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, Jaenisch R. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. **Cell** 1992; 71: 369–382.

Brohmann H, Jagla K, Birchmeier C. The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. **Development** 2000; 127: 437–445.

Brotto MA. Coupled expression of troponin T and troponin I isoforms in single skeletal muscle fibers correlates with contractility. **Am J Physiol Cell Physiol** 2005; 290: 567–576.

Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. The formation of skeletal muscle: From somite to limb. **J Anat** 2003; 202: 59–68.

Burd NA, De Lisio M. Skeletal Muscle Remodeling: Interconnections Between Stem Cells and Protein Turnover. **Exerc Sport Sci Rev** 2017; 45(3): 187–191.

Cantini M, Giurisat E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, Zaniolo G, Mazzoleni F, Vitiello L. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. **Neurol Sci** 2002; 23: 189–194.

Capitanio M, Canepari M, Cacciafesta P, Lombardi V, Cicchi R, Maffei M, Pavone F. S, Bottinelli R. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 2006; 103(1): 87–92.

Carlsson L, Yu JG, Thornell LE. New aspects of obscurin in human striated muscles. **Histochem Cell Biol** 2008; 130(1): 91–103.

Chapman DW, Simpson JA, Iscoe S, Robins T, Nosaka K. Changes in serum fast and slow skeletal troponin I concentration following maximal eccentric contractions. **J Sci Med Sport** 2013;16(1): 82–85.

Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev** 2004; 84(1): 209–238.

Chen TC, Chen HL, Lin MJ, Wu CJ, Nosaka K. Muscle damage responses of the elbow flexors to four maximal eccentric exercise bouts performed every 4 weeks. **Eur J Appl Physiol** 2009; 106: 267–275.

Chen Z, Maimaiti R, Zhu C, Cai H, Stern A, Mozdziak P, Ge Y, Ford SP, Nathanielsz PW, Guo W. Z-band and M-band titin splicing and regulation by RNA binding motif 20 in striated muscles. **J Cell Biochem** 2018; 119(12): 9986–9996.

Chitose R, Watanabe A, Asano M, Hanashima A, Sasano K, Bao Y, Maruyama K, Kimura S. Isolation of nebulin from rabbit skeletal muscle and its interaction with actin. **J Biomed Biotechnol** 2010; 10: 84-95.

Chu M, Gregorio CC, Pappas CT. Nebulin, a multi-functional giant. **J Exp Biol** 2016; 219:146-152.

Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. **Int J Biochem Cell Biol** 2013; 45(10): 2191-2199.

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2002; 18: 637-706.

Clarke NF, Ilkovski B, Cooper S, Valova VA, Robinson PJ, Nonaka I, Feng JJ, Marston S, North K. The pathogenesis of ACTA1-related congenital fiber type disproportion. **Ann Neurol** 2007; 61(6): 552-561.

Clarke NF. Congenital fiber-type disproportion. **Pediatric Neurology** 2011; 18: 264-271.

Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Med Sci Sports Exerc** 1992; 5: 512–520.

Coble J, Schilder RJ, Berg A, Drummond MJ, Rasmussen BB, Kimball SR. Influence of ageing and essential amino acids on quantitative patterns of troponin T alternative splicing in human skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab** 2015; 40(8): 788-796.

Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2: 769-776.

Collinson PO. Troponin T or troponin I or CK-MB (or none?). **Eur Heart J** 1998; 19: 16–24.

Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition, Eds. Sunderland MA. S, **The Cell**, USA, 2000, s. 106

Counsel P, Bredahl W. Muscle injuries of the lower leg. **Semin Musculoskelet Radiol** 2010; 14: 162-75.

Craig R, Padron R. Molecular Structure of the Sarcomere". Eds, Engel C, Franzini-Armstrong C, **Myology**, McGraw Hill, 2004, s.129-166.

Cramer RM, Langberg H, Magnusson P, Jensen CH, Schröder HD, Olesen JL, Suetta C, Teisner B, Kjaer M Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. **J Physiol** 2004; 558: 333-340.

Çubukcu S, Çay F, Bütün B, ve Kaçar C. "Terapötik Egzersizle: Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon İlkeler ve Uygulamalar", Eds. Arasıl T, Gök H, Yavuzer G. **Güneş Tıp Kitapevleri**, Ankara, 2007, s.389-433.

Cunha SR, Mohler PJ. Obscurin targets ankyrin-B and protein phosphatase 2A to the cardiac M-line. **J Biol Chem** 2008; 283: 31968–31980.

- Damas F, Nosaka K, Libardi CA, Chen TC, Ugrinowitsch C. Susceptibility to exercise-induced muscle damage: a cluster analysis with a large sample. *Int J Sports Med* 2016; 37: 633–640.
- Damas F, Phillips SM, Lixandrao ME, Vechin FC, Libardi CA, Roschel H, Tricoli V, Ugrinowitsch C. An inability to distinguish edematous swelling from true hypertrophy still prevents a completely accurate interpretation of the time course of muscle hypertrophy. *Eur J Appl Physiol* 2016; 116, 445–446.
- De Lisio MD, Jensen T, Sukiennik RA, Huntsman HD, Boppart MD. Substrate and strain alter the muscle-derived mesenchymal stem cell secretome to promote myogenesis. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5: 74.
- Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(3): 435-444.
- Dennis RA, Przybyla B, Gurley C, Kortebein PM, Simpson P, Sullivan DH, Peterson CA. Aging alters gene expression of growth and remodeling factors in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Physiol Genomics* 2008; 32(3): 393-400.
- Dickinson JM, D'Lugos AC, Naymik MA, Siniard AL, Wolfe AJ, Curtis DR, Huentelman MJ, Carroll CC. Transcriptome response of human skeletal muscle to divergent exercise stimuli. *J Appl Physiol* 2018; 124 (6):1529-1540.
- Dietrich S, Schubert FR, Gruss P, Lumsden A. The role of the notochord for epaxial myotome formation in the mouse. *Cell Mol Biol* 1999; 45: 601–616.
- Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 2011; 40: 169-186.
- Dominici M, LeBlanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
- Donkervoort S, Chan SHS, Hayes LH, Bradley N, Nguyen D, Leach ME, Mohassel P, Hu Y, Thangarajh M, Bharucha-Goebel D, Kan A, Ho RSL, Reyes CA, Nance J, Moore SA, Foley AR, Bönnemann CG. Cytoplasmic body pathology in severe ACTA1-related myopathy in the absence of typical nemaline rods. *Neuromuscul Disord* 2017; 27: 531-536.
- Doyle MJ, Zhou S, Tanaka KK, Pisconti A, Farina NH, Sorrentino BP, Olwin BB. Abcg2 labels multiple cell types in skeletal muscle and participates in muscle regeneration. *J Cell Biol* 2011; 195: 147–163.
- Durham WJ, Li YP, Gerken E, Farid M, Arbogast S, Wolfe RR, Reid MB. Fatiguing exercise reduces DNA binding activity of NF- κ B in skeletal muscle nuclei. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1740–1745.
- Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 2013; 17: 162–84.
- Epstein Y. Clinical significance of serum creatine phosphokinase activity levels following exercise. *Isr J Med Sci* 1995; 31: 698–699.

Erkanli K, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. **J Pineal Res**. 2005; 39(3): 238-242.

Fan GC, Gregory KN, Zhao W, Park WJ, Kranias EG. Regulation of myocardial function by histidine-rich, calcium-binding protein. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology** 2004; 287: 1705-1711.

Farup J, Rahbek SK, Knudsen IS, de Paoli F, Mackey AL, Vissing K. Whey protein supplementation accelerates satellite cell proliferation during recovery from eccentric exercise. **Amino Acids** 2014; 46: 2503–2516.

Feng JJ, Marston S. Genotype–phenotype correlations in ACTA1 mutations that cause congenital myopathies. **Neuromuscul Disord** 2009; 19: 6-16.

Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. **Am J Physiol** 1993; 265: 166-172.

Fitts RH. The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. **J Appl Physiol** 2008; 104(2): 551-558.

Flucher BE. Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. **Dev Biol** 1992; 154: 245–260.

Fontana S, Schillaci O, Frinchi M, Giallombardo M, Morici G, Di Liberto V, Alessandro R, De Leo G, Percivalle V, Belluardo N, Mudò G. Reduction in mdx mouse muscle degeneration by low-intensity endurance exercise: a proteomic analysis in quadriceps muscle of exercised compared with sedentary mdx mice. **Biosci Rep** 2015; 12: 35(3).

Franzini-Armstrong C. “The sarcoplasmic reticulum and the transverse tubules”, Eds. Engel AE, Franzini-Armstrong C. **Myology**, McGraw-Hill USA, New York, 1994, s.176-199.

Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcif Tissue Int** 2015; 96: 183–195

Fry CS, Kirby TJ, Kosmac K, McCarthy J, Peterson CA. Myogenic progenitor cells control extracellular matrix production by fibroblasts during skeletal muscle hypertrophy. **Cell Stem Cell** 2017; 20: 56–69.

Fry CS, Lee JD, Jackson JR, Kirby TJ, Stasko SA, Liu H, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. **FASEB** 2014; 28: 1654–1665.

Fu F, Nie J, Tong TK. Serum cardiac troponin T in adolescent runners: effects of exercise intensity and duration. **Int J Sports Med** 2009; 30: 168–172.

Fuchs B, Zumstein M, Regenfelder F, Steinmann P, Fuchs T, Husmann K, Hellermann J, Jost B, Hodler J, Born W, Gerber C. Upregulation of alpha-skeletal muscle actin and myosin heavy polypeptide gene products in degenerating rotator cuff muscles. **J Orthop Res** 2008; 26(7): 1007-1011.

Geeves MA, Fedorov R, Manstein DJ. Molecular mechanism of actomyosin-based motility. **Cell Mol Life Sci** 2005; 62: 1462–1477.

Giannoni A, Giovannini S, Clerico A. Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? **Clin Chem Lab Med** 2009; 47: 1167–1177.

Golini L, Chouabe C, Berthier C, Cusimano V, Fornaro M, Bonvallet R. Junctophilin 1 and 2 proteins interact with the L-type Ca²⁺ channel dihydropyridine receptors (DHPRs) in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry** 2011; 286: 43717-43725.

Gomes AV, Barnes JA, Harada K, Potter JD. Role of troponin T in disease. **Mol Cell Biochem** 2004; 263: 115-129.

Goodpaster BH, Sparks LM. Metabolic flexibility in health and disease. **Cell Metab** 2017; 25: 1027–1036.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiol Rev** 2000; 80(2): 853-924.

Goulding M, Lumsden A, Paquette AJ. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. **Development** 1994, 120: 957–971.

Grasii G, Seravalle G, Calhoun D, Bolla GB, Mancina G. Physical exercise in essential hypertension. **Chest** 1992; 101(5): 312-314.

Guo Q, Miller D, An H, Wang H, Lopez J, Lough D, He L, Kumar A. Controlled Heat Stress Promotes Myofibrillogenesis during Myogenesis. **PLoS One** 2016; 11(11): e0166294.

Günther M, Häufle DFB, Schmitt S. The basic mechanical structure of the skeletal muscle machinery: One model for linking microscopic and macroscopic scales. **J Theor Biol** 2018; 456: 137-167.

Hanula D. The Swim Coaching Bible. **Human Kinetics** 2001; 21: 133.

Harju AK, Botorabi F, Kuuslahti M, Supuran CT, Parkkila S. Carbonic anhydrase III: A neglected isozyme is stepping into the limelight. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry** 2013; 28(2): 231-239.

Hashimoto M, Saito N, Ohta H, Yamamoto K, Tashiro A, Nakazawa K, Inanami O, Kitamura H. Inhibition of ubiquitin-specific protease 2 causes accumulation of reactive oxygen species, mitochondria dysfunction, and intracellular ATP decrement in C2C12 myoblasts. **Physiol Rep** 2019; 7(14): e14193.

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature** 1993; 364: 501–506.

Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. **J Appl Physiol** 2001; 91: 534–551.

Heckman CJ, Enoka RM. Motor unit. **Compr Physiol** 2012; 2(4): 2629-2682.

Hoppeler H. The different relationship of VO₂max to muscle mitochondria in humans and quadrupedal animals. **Respir Physiol** 1990; 80: 137-145.

Hori K, Tsujii M, Iino T, Satonaka H, Uemura T, Akeda K, Hasegawa M, Uchida A, Sudo A. Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb. *BMC Musculoskelet Disord* 2013; 27 (14): 113.

Hornemann T, Stolz M, Wallimann T. Isoenzyme-specific interaction of muscle-type creatine kinase with the sarcomeric M-line is mediated by NH₂ – terminal lysine charge-clamps. *J Cell Biol* 2000; 149: 1225–1234.

Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84: 822-832.

Huntsman HD, Zachwieja N, Zou K, Ripchi P, Valero MC, De Lisio M, Boppart MD. Mesenchymal stem cells contribute to vascular growth in skeletal muscle in response to eccentric exercise. *Am J Physiol* 2013; 304(1), 72-81.

Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, Lee I. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* 2011; 11: 369-381.

Huxley AF, Taylor RE. Local activation of striated muscle fibres. *Journal of Physiology* 1958; 144(3): 426–441.

Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 1954; 173(4412): 973-976.

Hyldahl RD, Chen TC, Nosaka K. Mechanisms and Mediators of the Skeletal Muscle Repeated Bout Effect. *Exerc Sport Sci Rev* 2017; 45(1): 24-33.

Hyldahl RD, Xin L, Hubal MJ, Moeckel CS, Chipkin S, Clarkson PM. Activation of nuclear factor- κ B following muscle eccentric contractions in humans is localized primarily to skeletal muscle-residing pericytes. *FASEB J* 2011; 25(9), 2956-2966.

Imaoka Y, Kawai M, Mori F, Miyata H. Effect of eccentric contraction on satellite cell activation in human vastus lateralis muscle. *J Physiol Sci* 2015; 65(5): 461-469.

Jin JP, Wang K. Cloning, expression, and protein interaction of human nebulin fragments composed of varying numbers of sequence modules. *J Biol Chem* 1991; 266(31): 21215-21223.

Joe AW, Yi L, Natarajan A. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 153–163.

Kalyon TA. Spor Hekimliği, Ankara, *Gata Basımevi*, 2000, s.4-75.

Kaminski HJ, Li Z, Richmonds C, Lin F, Medof ME. Complement regulators in extraocular muscle and experimental autoimmune myasthenia gravis. *Exp Neurol* 2004; 189: 333–342.

Karhumaa P, Leinonen J, Parkkila S, Kaunisto K, Tapanainen J, Rajaniemi H. The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 11604–11608.

- Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. **Nature** 2004; 431(7007): 466-471.
- Keating A. Mesenchymal stromal cells. **Curr Opin Hematol** 2006; 13: 419–425.
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara, **Palme Yayıncılık**, 2006, 618.
- Kitamura H, Kimura S, Shimamoto Y, Okabe J, Ito M, Miyamoto T. Ubiquitin-specific protease 2–69 in macrophages potentially modulates meta-inflammation. **FASEB J** 2013; 27: 4940–4953.
- Kitamura H, Ishino T, Shimamoto Y, Okabe J, Miyamoto T, Takahashi E. Ubiquitin-specific protease 2 modulates the lipopolysaccharide-elicited expression of proinflammatory cytokines in macrophage-like HL-60 cells. **Mediators Inflamm** 2017; 2017: 6909415.
- Klein O, Strohschein K, Nebrich G, Oetjen J, Trede D, Thiele H, Alexandrov T, Giavalisco P, Duda GN, von Roth P, Geissler S, Klose J, Winkler T. MALDI imaging mass spectrometry: discrimination of pathophysiological regions in traumatized skeletal muscle by characteristic peptide signatures. **Proteomics** 2014; 14(20): 2249-2260.
- Kontogianni-Konstantopoulos A, Jones EM, Van Rossum DB, Bloch RJ. Obscurin is a ligand for small ankyrin 1 in skeletal muscle. **Mol Biol Cell** 2003; 14: 1138–1148.
- Kontogianni-Konstantopoulos A, Ackermann MA, Bowman AL, Yap SV, Bloch RJ. Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. **Physiol Rev** 2009; 89: 1217–1267.
- Koopman WJH, Verkaart S, Visch HJ, van Emst-de Vries S, Nijtmans LGJ, Smeitink JAM, Willems PHGM. Human NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? **Am J Physiol Cell Physiol** 2007; 293: 22-29.
- Koskinen SOA, Kyröläinen H, Flink R, Selänne HP, Gagnon SS, Ahtiainen JP, Nindl BC, Lehti M. Human skeletal muscle type 1 fibre distribution and response of stress-sensing proteins along the titin molecule after submaximal exhaustive exercise. **Histochem Cell Biol** 2017;148(5): 545-555.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS** 2001; 495 (1–2): 12-15.
- Kraemer RR, Castracane VD. Endocrine alterations from concentric vs. eccentric muscle actions: a brief review. **Metabolism** 2015; 64(2): 190-201.
- Krüger M and Kötter S. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. **Front Physiol** 2016; 7: 76.
- Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. **Biochem J** 2002; 368: 545–553.
- Labeit D, Watanabe K, Witt C, Fujita H, Wu Y, Lahmers S. Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. **Proc Natl Acad Sci** 2003; 100: 13716–13721.

Laing NG, Dye DE, Wallgren-Pettersson C, Richard G, Monnier N, Lillis S, Winder TL, Lochmüller H, Graziano C, Mitrani-Rosenbaum S, Twomey D, Sparrow JC, Beggs AH, Nowak KJ. Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Hum Mutat* 2009; 30(9): 1267-77.

Lamb GD. Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 2002; 23(1): 81-91.

Lange S, Agarkova I, Perriard JC, Ehler E. The sarcomeric M-band during development and in disease. *J Muscle Res Cell Motil* 2005; 26: 375-379.

Larsson L, Biral D, Campione M, Schiaffino S. An age-related type IIB to IIX myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 1993; 147: 227-234.

Lazar JM, Khanna N, Chesler R, Saliccioli L. Swimming and the heart. *Int J Cardiol* 2013; 168(1):19-26.

Leanne WF, Alison B, Gregory B, Karen M, John L, Sarah N, Michael C, Corvera S. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitiser rosiglitazone. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1085–1094.

Lebrasseur NK, Coté GM, Miller TA, Fielding RA, Sawyer DB. Regulation of neuregulin/ErbB signaling by contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 284(5): 1149-1155.

Lehti TM, Kalliokoski R, Komulainen J. Repeated bout effect on the cytoskeletal proteins titin, desmin, and dystrophin in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2007; 28: 39–47.

Li B, Zhuang L, Trueb B. Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1. *J Biol Chem* 2004; 279, 20401-20410.

Li S, Chopra A, Keung W, Chan C, Costa KD, Kong CW, Hajjar RJ, Chen C, Li R. Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase is a more effective calcium remover than Sodium-Calcium Exchanger in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 10: 1152.

Lichtman JW, Magrassi L, Purves D. Visualization of neuromuscular junctions over periods of several months in living mice. *J Neurosci* 1987; 7: 1215-1222.

Lippi G, Schena F, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(9): 1313-1318.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL. "Muscle: A Specialized Contractile Machine", Eds. Freeman WH, *Molecular Cell Biology*, New York, 2000, s.36.

Lovering RM, Brooks SV. Eccentric exercise in aging and diseased skeletal muscle: good or bad? *J Appl Physiol* 2013; 116(11): 1439-1445

Luo GF, Yu TY, Wen XH, Yang GS, Alteration of mitochondrial oxidative capacity during porcine preadipocyte differentiation and in response to leptin. *Mol Cell Biochem* 2008; 307: 83–91

Luo L, Lu AM, Wang Y, Hong A, Chen Y, Hu J, et al. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/ mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Exp Gerontol* 2013; 48: 427-436.

Luther PK, Squire JM. Muscle Z-band ultrastructure: titin Zrepeats and Z-band periodicities do not match. *J Mol Biol* 2002; 319: 1157–1164.

Ma K and Wang K. Interaction of nebulin SH3 domain with titin PEVK and myopalladin: implications for the signaling and assembly role of titin and nebulin. *FEBS Lett* 2002; 532: 273-278.

Ma K, Forbes JG, Gutierrez-Cruz G, Wang K. Titin as a giant scaffold for integrating stress and Src homology domain 3-mediated signaling pathways: the clustering of novel overlap ligand motifs in the elastic PEVK segment. *J Biol Chem* 2006; 281: 27539-27556.

Macaluso F and Myburgh KH. Current evidence that exercise can increase the number of adult stem cells. *J Muscle Res Cell Motil* 2012; 33: 187–198.

Malm C, Sjödin TL, Sjöberg B, Lenkei R, Renström P, Lundberg IE, Ekblom B Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *J Physiol* 2004; 556: 983-1000.

Margaritis I, Tessier F, Prou E, Marconnet P, Marini JF. Effects of endurance training on skeletal muscle oxidative capacities with and without selenium supplementation. *J Trace Elem Med Biol*. 1997 Apr;11(1):37-43.

Marieb-Elaine N. "Human Anatomy and Physiology", Eds. Hoehn K, *Pearson Education*, Melbourne, 2007, s.407-421.

Maroto M, Reshef R, Munsterberg AE, Koester S, Goulding M, Lassar AB. Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* 1997; 89: 139–148.

Martin JS, Padilla J, Jenkins NT, Crissey JM, Bender SB, Rector RS, Thyfault JP, Laughlin MH. Functional adaptations in the skeletal muscle microvasculature to endurance and interval sprint training in the type 2 diabetic OLETF rat. *J Appl Physiol* 2012; 113(8): 1223-1232.

Martinez-Amat A, Boulaiz H, Prados J, Marchal JA, Padial-Puche P, Caba O, RodriguezSerrano F, Aranega A. Release of a-actin into serum after skeletal muscle damage. *Br J Sports Med* 2005; 39: 830–834.

Martinez-Amat A, Marchal-Corrales JA, Rodriguez-Serrano F, Boulaiz H, Prados-Salazar JC, Hita-Contreras F, Perez OC, Delgado EC, Martin I, Jimenez AA. Role of a-actin in muscle damage of injured athletes in comparison with traditional markers. *Br J Sports Med* 2007; 41: 442–446.

Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. **Nat Cell Biol** 2000; 10: 1038.

McCarthy J, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Van Zant G, Campbel KS, Esser KA, Dupont-Versteegden EE, Peterson CA. Effective fiber hypertrophy in satellite cell depleted skeletal muscle. **Development** 2011; 138: 3657–3666.

McCully KK, Faulkner JA. Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. **J Appl Physiol** 1985; 59: 119–126.

McHugh MP, Connolly DAJ, Eston RG, Gleim GW. Exercise Induced Muscle Damage And Potential Mechanisms Forthe Repeated Bout Effect. **Sports Medicine** 1998; 27: 157-170.

McHugh, MP, Connolly, DA, Eston, RG, and Gleim, GW. Electromyographic analysis of exercise resulting in symptoms of muscle damage. **J Sport Sci** 2000; 18: 163–172.

McKay BR, DeLisio M, Johnston AP, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G. Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. **PLoS One** 2009; 4: e6027.

McPhee JS, French DP, Jackson D, Nazroo J, Pendleton N, Degens H. Physical activity in older age: perspectives for healthy ageing and frailty. **Biogerontology** 2016; 17: 567–580.

Meyer LC and Wright NT. Structure of giant muscle proteins. **Front Physiol** 2013; 4: 368.

Miller JB, Schaefer L, Dominov JA. Seeking muscle stem cells. **Curr Top Dev Biol** 1999; 43: 191–219.

Mitchell KJ, Pannerec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, Marazzi G, Sassoon DA. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. **Nat Cell Biol** 2010; 12: 257–266.

Moore DR, Bryon R, McKay MA, Tarnopolsky Gianni Parise. Blunted satellite cell response is associated with dysregulated IGF-1 expression after exercise with age. **European Journal of Applied Physiology** 2018; 118: 2225–2231.

Moshiri M, Mousavi SR, Etemad L. Hypoglycemia and revisable ST-elevation induced by Movento. **Int J Appl Basic Med Res** 2016; (4): 284-286.

Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Muscle CD31(-)CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. **Am J Pathol** 2008; 173: 781–791.

Müller AE, Kreiner M, Kötter S, Lassak P, Bloch W, Suhr F. Acute exercise modifies titin phosphorylation and increases cardiac myofilament stiffness. **Front. Physiol** 2014; 5: 449.

Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development** 2011; 138: 3625–3637.

Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 1993; 364: 532–535.

Nederveen, J.P., Joanisse, S., Séguin, C.M., Bell, K.E., Baker, S.K., Phillips, S.M. ve Parise, G. The effect of exercise mode on the acute response of satellite cells in old men. *Acta Physiol* 2015; 215(4): 177-190.

Neubauer O, Sabapathy S, Ashton KJ, Desbrow B, Peake JM, Lazarus R, Wessner B, Cameron-Smith D, Wagner KH, Haseler LJ, Bulmer AC. Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. *J Appl Physiol* 2014; 116: 274-287.

Neubauer O, Sabapathy S, Lazarus R, Jowett JB, Desbrow B, Peake JM, Cameron-Smith D, Haseler LJ, Wagner KH, Bulmer AC. Transcriptome analysis of neutrophils after endurance exercise reveals novel signaling mechanisms in the immune response to physiological stress. *J Appl Physiol* 2013; 114: 1677-1688.

Ochi E, Nakazato K, Ishii N. Effects of eccentric exercise on joint stiffness and muscle connectin (titin) isoform in the rat hindlimb. *J Physiol Sci* 2007; 57(1): 1-6.

Onuoha GN, Alpar EK, Dean B, Tidman J, Rama D, Laprade M. Skeletal troponin-I release in orthopedic and soft tissue injuries. *J Orthop Sci* 2001; 6: 11–15.

Ordahl CP, Williams BA, Denetclaw W. Determination and morphogenesis in myogenic progenitor cells: An experimental embryological approach. *Curr Top Dev Biol* 2000; 48: 319–367.

O'Reilly C, McKay B, Phillips S, Tarnopolsky M, Parise G. Hepatocyte growth factor (HGF) and the satellite cell response following muscle lengthening contractions in humans. *Muscle Nerve* 2008; 38(5): 1434-1442.

Pappas CT, Bhattacharya N, Cooper JA, Gregorio CC. Nebulin interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc. *Mol Biol Cell* 2008; 19(5): 1837-1847.

Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc Immunol Rev* 2012; 18: 42–49.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 457-465.

Pellegrino J, Ruby BC, Dumke CL. Effect of Plyometrics on the Energy Cost of Running and MHC and Titin Isoforms. *Med Sci Sports Exerc* 2016; 48(1): 49-56.

Pirkanen A, Kiefer JC, Hauschka SD. IGFs, insulin, Shh, bFGF, and TGF-1 interact synergistically to promote somite myogenesis in vitro. *Dev Biol* 2000; 224: 189–203.

- Potts GK, McNally RM, Blanco R, You JS, Hebert AS, Westphall MS, Coon JJ, Hornberger TA. A map of the phosphoproteomic alterations that occur after a bout of maximal-intensity contractions. *J Physiol* 2017; 595(15): 5209-5226.
- Prasad DS and Das BC. Physical inactivity: A cardiovascular risk factor. *Indian J Med Sci* 2009; 63: 33-34.
- Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cumf J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157: 851–864.
- Raastad T, Owe SG, Paulsen G, Enns D, Overgaard K, Crameri R, Kiil S, Belcastro A, Bergersen L, Hallén J. Changes in calpain activity, muscle structure, and function after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(1):86-95.
- Raisanen SR, Lehenkari P, Tasanen M, Rahkila P, Härkönen PL, Väänänen HK. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB J* 1999;13: 513–522.
- Randazzo D, Pierantozzi E, Rossi D, Sorrentino V. The potential of obscurin as a therapeutic target in muscle disorders. *Expert Opin Ther Targets* 2017; 21(9): 897-910.
- Rebbeck RT, Karunasekara Y, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, Dulhunty AF. Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners? *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 48: 28-38.
- Redd MJ, Hoffman JR, Gepner Y, Stout JR, Hoffman MW, Ben-Dov D, Funk S, Church DD, Avital G, Chen Y, Frankel H, Ostfeld I. The effect of HMB ingestion on the IGF-I and IGF binding protein response to high intensity military training. *Growth Horm IGF Res* 2017; 32: 55-59.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes & Dev* 2004; 18: 1088–1105.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham MA Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 2005; 435: 948–953.
- Rudnicki MA, Hinuma BS, Jaenisch R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 1992; 71: 383–390.
- Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J* 2013; 280(17): 4118-4130.
- Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* 2011; 138(17): 3647-3656.
- Samelman TR. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol* 2000; 85(1): 92-102.

- Sanger JW, Chowrashi P, Shaner NC, Spalhoff S, Wang J, Freeman NL, Sanger JM. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 403 Suppl: 153-162.
- Sheng JJ, Jin JP. TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, regulation, and protein structure-function relationships. *Gene* 2016; 57: 385-94.
- Schiaffino S and Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* 2011; 1: 1-4.
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews* 2011; 91: 1447-1531.
- Schilder RJ, Kimball SR, Marden JH, Jefferson LS. Body weight-dependent troponin T alternative splicing is evolutionarily conserved from insects to mammals and is partially impaired in skeletal muscle of obese rats. *J Exp Biol* 2011; 214:1523-1532.
- Schleip R, Jäger H, Klingler W. What is 'fascia'? A review of different nomenclatures. Fascia science and clinical applications: nomenclature review. *Journal of Bodywork and Movement Therapies* 2012; 16 (4): 496-502.
- Schneider CM, Dennehy CA, Rodearmael S J, Hayvard JR. Effects Of Physial Activity On Creatiane Phopshokinase And The Isoenzyme Creatine Kinase –Mb. *Ann Emerg Med* 1995; 25(4): 520-524.
- Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res* 2010; 24(10): 2857-2872.
- Sciorati C, Rigamonti E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ* 2016; 23(6): 927–937.
- Scomparin, DX, Grassioli, S, Gomes, RM, Torrezan R, de Oliveira, JC, Gravena C, Pêra CC, Mathias PC. Low-Intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice. *Endocrin Res* 2011; 36(2): 83-90.
- Sen CK, Marin E, Kretzschmar M, Hänninen O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* 1992; 73(4): 1265-1272.
- Sengle G, Carlberg V, Tufa SF, Charbonneau NL, Smaldone S, Carlson EJ, Ramirez F, Keene DR, Sakai LY. Abnormal Activation of BMP Signaling Causes Myopathy in Fbn2 Null Mice. *PLoS Genet* 2015; 26: 11(6): e1005340.
- Serrano AL, Jardi M, Suelves M, Klotman PE, Munoz-Canoves P. HIV-1 transgenic expression in mice induces selective atrophy of fast-glycolytic skeletal muscle fibers. *Frontiers in Bioscience* 2008; 13: 2797-2805
- Sheng JJ, Jin JP. TNNI1, TNNI2 and TNNI3: evolution, regulation, and protein structure- function relationships. *Gene* 2016; 576 (15): 385-394.
- Shi X and Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 2006; 20: 1692–1708.

Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. **FEBS Lett** 1998; 423(3): 275-280.

Smiles WJ, Hawley JA, Camera DM. Effects of skeletal muscle energy availability on protein turnover responses to exercise. **J Exp Biol** 2016; 219: 214–225.

Smith HK, Pyley MJ, Rodgers CD, McKee NH. Skeletal muscle damage in the rat hindlimb following single or repeated daily bouts of downhill exercise. **Int J Sports Med** 1997; 18, 94–100.

Sonnet C, Lafuste P, Arnold L, Brigitte M, Poron F, Authier FJ, Chretien F, Gherardi RK, Chazaud B. Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. **J Cell Sci** 2006; 119: 2497-2507.

Sorichter S, Mair J, Koller A. Skeletal muscle troponin I release and magnetic resonance imaging signal intensity changes after eccentric exercise-induced skeletal muscle injury. **Clin Chim Acta** 1997; 262: 139.

Sweeney HL, Houdusse A. Structural and functional insights into the myosin motor mechanism. **Annu Rev Biophys** 2010; 39: 539–557.

Sweeney HL, Houdusse A. The motor mechanism of myosin V: insights for muscle contraction. **Phil Trans R Soc B** 2004; 359: 1829–1841.

Tafari M, Karpnich NO, Hurster KA, Pastorino JG, Schneider T, Russo MA, Farber JL. Cytochrome c release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition. **J Biol Chem** 2002; 277(12): 10073-10082.

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. **Cell** 1997; 89: 127–138.

Takekura H, Tamaki H, Nishizawa T, Kasuga N. Plasticity of the transverse tubules following denervation and subsequent reinnervation in rat slow and fast muscle fibres. **Journal of Muscle Research and Cell Motility** 2003; 24: 439-451.

Tanaka H. Swimming exercise: impact of aquatic exercise on cardiovascular health. **Sports Med** 2009; 39(5): 377-387.

Tang JE, Perco JG, Moore DR, Wilkinson SB, Phillips SM. Resistance training alters the response of fed state mixed muscle protein synthesis in young men. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2008; 294: 172–178.

Tantiwong P, Shanmugasundaram K, Monroy A, Ghosh S, Li M, DeFronzo RA, Cersosimo E, Sriwijitkamol A, Mohan S, Musi N. NF- κ B activity in muscle from obese and type 2 diabetic subjects under basal and exercise-stimulated conditions. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2010; 299: 794-801.

Teran-Garcia M, Rankinen T, Koza RA, Rao DC, Bouchard C. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2005; 288: 1168–1178.

Theeuwes WF, Gosker HR, Langen RCJ, Pansters NAM, Schols AMWJ, Remels AHV. Inactivation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) enhances mitochondrial

- biogenesis during myogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864(9): 2913-2926.
- Thomas GD. Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Front Physiol* 2013; 4: 1–6.
- Thompson HS, Scordilis SP, De Souza MJ. Serum creatine kinase activity varies with ovulatory status in regularly exercising, premenopausal women. *Hormone Research* 2006; 65(3): 151–158.
- Trappe TA, Carrithers JA, White F, Lambert CP, Evans WJ, Dennis RA. Titin and nebulin content in human skeletal muscle following eccentric resistance exercise. *Muscle Nerve* 2002; 25(2): 289-292.
- Tzu-Shao Y, Chi-Chang H, Hsiao-Li C, Mei-Chieh H. Angelica sinensis Improves Exercise Performance and Protects against Physical Fatigue in Trained Mice. *Molecules* 2014; 19(4): 3926–3939.
- Udaka J, Ohmori S, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Disuse-induced Preferential Loss of the Giant Protein Titin Depresses Muscle Performance via Abnormal Sarcomeric Organization. *J Gen Physiol* 2008; 131(1): 33–41.
- Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 143–152.
- Vaananen HK, Kumpulainen T, Korhonen LK. Carbonic anhydrase in the type I skeletal muscle fibers of the rat. An immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 1109–1113.
- Valero MC, Huntsman HD, Liu J, Zou K, Boppart MD. Eccentric exercise facilitates mesenchymal stem cell appearance in skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7: e29760.
- Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 2002; 3: 944-950.
- Wada M, Kuratani M, Kanzaki K. Calcium kinetics of sarcoplasmic reticulum and muscle fatigue. *J Phys Fit Sports Med* 2013; 2: 169–178.
- Walsh MP. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications. *IUBMB Life* 2011; 63(11): 987-1000.
- Wang K, Williamson CL. Identification of an N2 line protein of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(6): 3254-3258.
- Wang XQ, Sun P, Paller AS. Inhibition of integrin-linked kinase/protein kinase B/Akt signaling: mechanism for ganglioside-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 44504-44511.
- Waskiw-Ford M, Fung JW, Gavel E, Ivanisevic O, Malowany JM, Rosenblatt M. Revealing the 'obscurin': mapping the path to new discovery with the phosphoproteome. *J Physiol* 2018; 596(6): 961–962.

Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 1993; 75: 1241–1244.

White SP, Cohen C, Phillips GN. Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* 1992; 325(6107): 826–828.

Widmair EP, Raff H, Strang KT, “Skeletal Muscle”, Eds. Patterson J, **Vanders**, McGraw-Hill USA, New York, 2014, s.257-284.

Wilmore JH, Costill DL. Physical energy: fuel metabolism. *Nutr Rev* 2001; 59(2): 13-16.

Witt CC, Burkart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, Labeit S. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J* 2006; 25: 3843-3855.

Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 475–482.

Wosczyzna MN, Biswas AA, Cogswell CA, Goldhamer DJ. Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP- dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 1004–1017.

Xie M, Jiang L, Dun Y, Zhang W, Liu S. Trimetazidine combined with exercise improves exercise capacity and anti-fatal stress ability through enhancing mitochondrial quality control. *Life Sci*. 2019; (1)224: 157-168.

Yamada T, Kunioka Y, Wakayama J, Aimi M, Noguchi YS, Akiyama N, Kayamori T. Molecular organizations of myofibrils of skeletal muscle studied by atomic force microscopy. *Adv Exp Med Biol* 2003; 538: 285-294.

Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 2013; 93: 23–67.

You-Na J, Eun-Joo B. JAK-STAT pathway and myogenic differentiation. *JAKSTAT* 2013; 2(2): e23282.

Young P, Ehler E, Gautel M, Sanger JW, Sanger JM, Obscurin. A giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J Cell Biol* 2001; 154: 123–136.

Yu JG, Carlsson L, Thornell LE. Evidence for myofibril remodeling as opposed to myofibril damage in human muscles with DOMS: an ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Histochem Cell Biol* 2004; 121(3): 219-227.

Yu JG, Fürst DO, Thornell LE. The mode of myofibril remodelling in human skeletal muscle affected by DOMS induced by eccentric contractions. *Histochem Cell Biol* 2003; 119(5): 383-393.

Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 2013; 21(4): 501-515.

Zhang L, Zhao X, Zhang M, Zhao W, and Gao C. Ubiquitin-specific protease 2b negatively regulates IFN- β production and antiviral activity by targeting TANK-binding kinase 1. *J Immunol* 2014: 195; 2230–2237.

Zhang WB, Yao LL, Li XD. The Globular Tail Domain of Myosin-5a Functions as a Dimer in Regulating the Motor Activity. **J Biol Chem** 2016; 291(26): 13571-13579.

Zhang S, Zhang Y, Zhou X, Fu X, Michal JJ, Ji G, Du M, Davis JF, Jiang Z. Alternative polyadenylation drives genome-to-phenome information detours in the AMPK α 1 and AMPK α 2 knockout mice. **Sci Rep** 2018; 8(1): 62-64.

Zou K, Huntsman HD, Valero MC, Adams J, Skelton J, De Lisio M, Jensen T, Boppart MD. Mesenchymal stem cells augment the adaptive response to eccentric exercise. **Med Sci Sports Exerc** 2015; 47: 315–325.



8. ÖZGEÇMİŞ

29.07.1987 tarihinde Zürih'te dünyaya gelen Özgen KILIÇ-ERKEK ilk öğrenimini Schulhaus Lindenbüel'de, orta öğrenimini Zentralschulhaus İlkokulu'nda ve Doğan Demircioğlu Okulu'nda, lise öğrenimini ise Denizlispor Koleji'nde tamamladı. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdi. 2011 yılının Eylül ayında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksekisans eğitime ve 2014 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitime başlamıştır. Evli ve 1 kız çocuk annesi olan Özgen KILIÇ ERKEK, 2014 yılı Ocak ayından beri Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde, 2017 yılı Aralık ayından itibaren Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

9. EKLER

Ek-1. Kursunluoglu-Akcilar R, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Turgut S, Bor-Kucukatay M. Apelin induced hemorheological alterations in DOCA-salt hypertensive rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014; 56(1): 75-82.

Ek-2. Findikoglu G, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Senol H, Bor-Kucukatay M. Acute effects of continuous and intermittent aerobic exercises on hemorheological parameters: A pilot study. *Biorheology* 2014; 51(4-5): 293-303.

Ek-3. Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye (Lond)* 2014; 28(3): 285-289.

Ek-4. Isik-Balci Y, Tancer-Elci H, Bor-Kucukatay M, **Kilic-Erkek O**, Kilic-Toprak E, Senol H, Rota S. Investigation of hemorheological parameters at the diagnosis and follow up of children with iron deficiency anemia and mixed anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 60(2): 179-189.

Ek-5. Kilic-Toprak E, Yapici A, **Kilic-Erkek O**, Köklü Y, Tekin V, Alemdaroglu U, Bor-Kucukatay M. Acute effects of Yo-Yo intermittent recovery test level 1 (Yo-YoIR1) on hemorheological parameters in female volleyball players. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 60(2), 191-199.

Ek-6. Tancer-Elci H, Isik-Balci Y, Bor-Kucukatay M, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Senol H, Aybek H. Investigation of hemorheological parameters at the diagnosis and the follow-up of nutritional vitamin b12 deficient children. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 60(3): 273-282.

Ek-7. **Kilic-Erkek O**, Mergen-Dalyanoglu M, Kilic-Toprak E, Ozkan S, Bor-Kucukatay M, Turgut S. Exercise training and detraining process affects plasma adiponectin level in healthy and spontaneously hypertensive rats. *Bratisl Lek Listy* 2015; 116(12), 741-745.

Ek-8. **Kilic-Erkek O**, Kilic-Toprak E, Caliskan S, Ekbic Y, Akbudak İH, Kucukatay V, Bor-Kucukatay M. Detraining reverses exercise-induced improvement in blood pressure associated with decrements of oxidative stress in various tissues in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2016; 412(1-2): 209-219.

Ek-9. Isik-Balci Y, Agladioglu S, Agladioglu K, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Ozhan B, Polat A, Bor-Kucukatay M. Impaired Hemorheological Parameters and Increased Carotid Intima-Media Thickness in Children with Subclinical Hypothyroidism. *Horm Res Paediatr.* 2016; 85(4): 250-256.

- Ek-10. Kilic-Toprak E, Toprak I, **Kilic-Erkek O**, Kucukatay V, Bor-Kucukatay M. Increased erythrocyte aggregation in patients with primary open angle glaucoma. *Clin Exp Optom* 2016; 99(6): 544-549.
- Ek-11. Ugurlu E, Kilic-Toprak E, Altinisik G, **Kilic-Erkek O**, Cengiz B, Kucukatay V, Senol H, Akbudak IH, Ekbic Y, Bor-Kucukatay M. Increased erythrocyte aggregation and oxidative stress in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2016; 33: 308-316.
- Ek-12. Ugurlu E, Kilic-Toprak E, Can I, **Kilic-Erkek O**, Altinisik G, Bor-Kucukatay M. Impaired Hemorheology in Exacerbations of COPD. *Can Respir J* 2017; 1: 286263. (2017). doi: 10.1155/2017/1286263.
- Ek-13. Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Abban-Mete G, Caner V, Baris IC, Turhan G, Kucukatay V, Senol H, Kuru O, Bor-Kucukatay M. Contribution of Heme Oxygenase 2 to Blood Pressure Regulation in Response to Swimming Exercise and Detraining in Spontaneously Hypertensive Rats. *Med Sci Monit* 2018; 22(24): 5851-5859.
- Ek-14. Unver F, Kilic-Toprak E, **Kilic-Erkek O**, Korkmaz H, Yasin O, Oymak B, Oskay A, Bor-Kucukatay M. Hemorheological alterations following an acute bout of nordic hamstring exercise in active male participants¹. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018; 463-473.
- Ek-15. Kilic-Toprak E, Unver F, **Kilic-Erkek O**, Korkmaz H, Ozdemir Y, Oymak B, Oskay A, Bor-Kucukatay M. Increased erythrocyte aggregation following an acute bout of eccentric isokinetic exercise does not exceed two days. *Biorheology* 2018; 55 (1): 15-24.
- Ek-16. Akbudak IH, Kucukatay V, **Kilic-Erkek O**, Ozdemir Y, Bor-Kucukatay M, Investigation of the effects of major ozone autohemotherapy application on erythrocyte deformability and aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2019; 71(3): 365-372.