

**Osteoporotik Sıçan Dokularında
İskelet Kası Atrofisinin
İmmünohistoloji ve Moleküler Biyoloji Yöntemleriyle
Araştırılması**

Proje No: 109S344

Prof. Dr. Feza Korkusuz
Prof. Dr. Petek Korkusuz
Prof. Dr. Çetin Kocaefe
Y. Doç. Dr. Dilara Zeybek
Berna Kankılıç
Sezin Dağdeviren

NİSAN 2011
ANKARA

ÖNSÖZ

Bu raporda TÜBİTAK tarafından desteklenen 109S344 numaralı araştırma projesinden elde edilen sonuçlar özetlenmektedir. Proje kapsamında ovariyektomi uygulanmış osteoporotik sıçan modelinin iskelet kaslarının histolojik ve moleküler düzeyde değerlendirilmesi yapılmıştır. Osteoporoz, kemik yoğunluğundaki düşüş ve mikroyapısındaki bozukluğa bağlı olarak kemik kırılabilirliğinde artma olarak tanımlanan, menapoz sonrası kadınların %45'ini etkileyen ve yüksek sakatlık ile ölüm oranları bildirilen bir hastalıktır. Hastalığın küresel maliyeti IOF (International Osteoporosis Foundation) tahminlerine göre 2050 yılı itibarıyla 106 milyar Euroyu bulacaktır. Osteoporozla ilgili araştırmaların hemen hepsi kemik dokusu ve artan kırılabilirliğin önüne geçilmesine yönelik olarak gerçekleştirilmiş, buna karşın hareketin en önemli bileşenlerinden iskelet kas dokusundaki olası etkilenme nadiren araştırılmıştır. Osteoporoz oluşturulan hayvanların iskelet kası incelemelerinde kas atrofisi tanımlanmıştır. Proje öncesi pilot çalışmada ovariyektomi uygulanmış sıçan iskelet kasında kısmi atrofi ve güç kaybı gözlemlendiğinden bu çalışmada yapısal ve moleküler biyolojik değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada atrofi ve güç kaybı gösteren kas örneklerinin histolojik olarak ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde yapıları incelenmiş, atrofiyi belirleyen proteinlerle immün işaretlenme gerçekleştirilmiş ve çeşitli aday genlerin ekspresyon yolları araştırılmıştır. Ayrıca atrofi ve güç kaybını kısmen geri döndüren TNF-alfa antagonisti *Infliximab*'ın moleküler veya yapısal bir değişikliğe yol açıp açmadığı da bu çalışmada araştırılmıştır. Bulgular doğrultusunda ovariyektomiye bağlı postmenapozal osteoporozda işlev kaybının yanısıra iskelet kası dokularında yapısal ve moleküler biyolojik değişikliklerin olduğu, bu değişikliklerin kısmen TNF-alfa yolağı üzerinden geliştiği ve TNF-alfa antagonisti *infiximab*'ın bu bulguları kısmen düzelttiği belirlenmiştir. TNF-alfa antagonistleri geliştirilerek gelecekte postmenapozal osteoporozla bağlı iskelet kası atrofisinin önlenmesi veya tedavisinde kullanılabilir. Bu çalışmadan elde edilen moleküler biyolojik verilerin iskelet kası işlevi, yapısı ve genetiği dışında postmenapozal osteoporozla bağlı diğer organ ve dokulardaki olası değişiklikleri de aydınlatacak veri sağlama özelliği bulunmaktadır.

TÜBİTAK'a çalışmamıza desteği için teşekkür ederiz.

Prof. Dr. Feza Korkusuz
Proje Yürütücüsü
Nisan 2011

İÇİNDEKİLER

1. Önsöz	2
2. İçindekiler	3
3. Tablo ve Şekillerin Listesi	4
4. Özet	6
5. Abstract	7
6. Proje Ana Metni	8
Giriş	8
Genel Bilgiler	10
Amaçlar	14
Gereç ve Yöntemler	15
Çalışma tasarımı	15
Işık mikroskopisi	20
Elektron mikroskopisi	22
İmmünohistokimya	22
Gen ifade analizi	24
RNA izolasyonu	24
RNA konsantrasyonu ve kalite kontrolü	26
cDNA sentezi	28
Gerçek zamanlı (<i>Real Time</i>) RT-PCR	29
Primer dizilerinin hazırlanması	29
Global transkriptom profilenmesi (<i>Microarray Analysis</i>)	30
Bulgular	31
Işık mikroskopisi	31
Elektron mikroskopisi	36
İmmünohistokimya	39
Gen ifade analizi	44
Gerçek-Zamanlı PZR Gen İfade Analizi	55
Tartışma	58
Sonuç	63
Kaynaklar	65
Proje Özet Bilgi Formu	68

Tablo ve Şekillerin Listesi

Tablolar:

	Başlık	Sayfa
Tablo 1.	Ovariyektomi öncesi ve sonrası sol femur KMY'ları.	17
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan primer monoklonal antikolar.	23
Tablo 3.	RNA ölçümleri ve saflığına ilişkin absorbands analizi sonuçları.	27
Tablo 4.	EDL kasında farklılık gösteren molekül.	49
Tablo 5.	Soleus kasında farklılık gösteren genler.	49
Tablo 6.	Soleus ve Ekstensör Digitorum Longus kaslarında farklı vurgu gösteren genler.	50
Tablo 7.	Soleus ve Ekstensör Digitorum Longus kaslarından elde edilen RNA'lar bir havuzda toplandığında gruplar arasında farklılık gösteren gen vurguları.	51
Tablo 8.	Soleus ve Ekstensör Digitorum Longus kaslarından elde edilen RNA'lar bir havuzda toplandığında gruplar arasında farklılık gösteren 3 belirgin genin vurgusu.	53
Tablo 9.	Kontrol grubu ile ovariyektomi grubu arasında fark görülen genler	53
Tablo 10.	Hedef genler için GZ-PZR analizinde kullanılmak üzere tasarımı gerçekleştirilen primer çiftleri ve PZR ürün uzunlukları.	56
Tablo 11.	Hedef genler için karşılaştırmalı GZ-PZR sonuçları. Sonuçlar kontrol gruplara göre % değişikliği göstermektedir.	57

Şekiller:

	Başlık	Sayfa
Şekil 1.	Kemik kalitesi.	8
Şekil 2.	Osteoporozun önemi.	9
Şekil 3.	İskelet kası atrofisi ve hipertrofisi yolakları.	11
Şekil 4.	Kas yıkımında kaşeksi ve kullanılmama atrofisinin yolakları.	12
Şekil 5.	Çalışma tasarımı.	15
Şekil 6.	Sıçanların tüm vücut radyografisine bir örnek.	16
Şekil 7.	Sıçanların kemik mineral yoğunluğunun ölçülmesi.	17
Şekil 8.	Ovariyektomi ile yumurtalık tüplerinin bulunması ve bağlanması.	18
Şekil 9.	Ovariyektomiden 12 hafta sonra atrofik uterus	18
Şekil 10.	Uterus ağırlıkları.	19
Şekil 11.	EDL ve SOL kaslarının izolasyonu.	21
Şekil 12.	Spektrofotometrik yöntemle ölçülen RNA'nın kalite kontrolü verisi.	26
Şekil 13.	HE ile boyalı EDL kası kesitleri.	31
Şekil 14.	Kontrol, OVX, OVX-TNF uygulanmış soleus kası kesitleri.	32
Şekil 15.	NADH-TR boyanmış kesitler ve ölçüm sistemi.	33
Şekil 16.	EDL kaslarının her grup için kas lifi yüzdeleri.	33
Şekil 17.	EDL kaslarının trikrom, NADH-TR boyamaları, tip 1 ve tip 2 liflerinin çap ve alan grafikleri.	34
Şekil 18.	SOL kaslarının trikrom, NADH-TR boyamaları, tip 1 ve tip 2 liflerinin çap ve alan grafikleri	35
Şekil 19.	Kontrol grubunun elektronmikrografileri.	36
Şekil 20.	OVX grubunun elektronmikrografileri.	37
Şekil 21.	OVX-TNF grubunun elektronmikrografileri.	38
Şekil 22.	EDL ve SOL kaslarına ait örneklerde p65 molekülünün immün işaretlenmesi.	39
Şekil 23.	Myo D molekülünün immün işaretlenmesi.	40
Şekil 24.	p50 molekülünün immün işaretlenmesi.	41
Şekil 25.	C-Rel molekülünün immün işaretlenmesi.	42
Şekil 26.	Bcl3 molekülünün immün işaretlenmesi.	43
Şekil 27.	TNF-alfa reseptörü 1a'nın hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri.	44
Şekil 28.	C-Rel'in hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri.	45

Şekil 29.	Bcl3'ün hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri.	46
Şekil 30.	p50'nin hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri.	47
Şekil 31.	p65'in hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri.	48

ÖZET

Osteoporotik Sıçan Dokularında İskelet Kası Atrofisinin İmmünohistoloji ve Moleküler Biyoloji Yöntemleriyle Araştırılması

Osteoporozun etyopatogenezinde kemik dokuya yönelik çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiş olmasına karşın kas-iskelet sisteminin diğer bileşeni olan iskelet kasına yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır. Osteoporozda kemik patolojisinin yanısıra kas atrofisinin de görüldüğü bilinmektedir. Yaşlanması hızlandırılmış osteoporotik sıçanlarda daha önce yapılan iskelet kası incelemelerinde atrofi gözlenmiştir. Kas atrofisinin alt sinyal yollarının çoğu henüz aydınlatılmamıştır. Buna karşın kas atrofisinin üst sinyal yollarının oluş fizyolojisine bağlı farklılık gösterdikleri bilinmektedir. Kaşeksi NF-kappaB alt yolağının uyarmak için TNF-alfa üst yolağını kullanırken kullanmama atrofisinde TNF-alfa görev dışı kalmaktadır. Osteoporozda gözlenen kas atrofisinin ise alt ve üst sinyal yollarının moleküler biyolojisi henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada postmenapozal osteoporozu örnekleyen ovariyektomi gerçekleştirilmiş sıçan modelinden elde edilen iskelet kası dokularında yapısal değişikliklerin ve atrofisinin alt ve üst sinyal yolları immunohistokimyasal yöntemler ve gen ifade analizi çalışmaları ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çalışmada ovariyektomize (OVX) ve ovariyektomize+TNF-alfa antagonisti *infliximab* enjekte edilmiş (OVX-TNF) gruplarında lifler arasında ayrılma ve boyut farklılıkları, merkezi çekirdekler ve iyi korunmuş ince yapıya rastlanmıştır. Yavaş kasılan Tip I fiber yüzdesi, alanları ve çapları OVX ve OVX-TNF grubunun EDL kaslarında kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Yalnızca kaşektik atrofide artan p65 molekülünün çekirdeğe olan lokalizasyonunda ve ekspresyon miktarında OVX grubunda kontrol grubuna oranla artış belirlenmiştir. Kullanılmama atrofisinde artış gösteren Bcl3 ve C-Rel moleküllerinde ise gruplar arası farka rastlanmamıştır. Sonuç olarak TNF-alfa'nın OVX sıçanların iskelet kaslarında gözlemlenen işlev kaybında rolü olduğu, oluşan atrofisinin kaşektik TNF-alfa yolağı üzerinden oluştuğu ve TNF-alfa antagonisti enjeksiyonunun işlevsel kaybı engellediği gösterilmiştir. *Infliximab* uygulanması OVX sonrası gelişen değişiklikleri azaltmada kısmen etkili olsa da bu uygulama yapısal değişiklikleri engellemede tamamen yeterli olamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, iskelet kası, atrofi, TNF-alfa, ovariyektomi

ABSTRACT

Analysis of Skeletal Muscle Atrophy in Osteoporotic Rat Tissues by Immunohistochemistry and Molecular Biology Techniques

In the etiopathogenesis of osteoporosis, much of the research is focused on bone, and only very few researches involved muscle, which is the other element of musculoskeletal system. It is previously shown that muscle atrophy occurs in the skeletal muscles of senescence accelerated osteoporotic rats that may be related to osteoporotic bone loss. The signaling pathways leading to atrophy are not all clear yet but it is known that there are some differences in the upper part of pathways according to the factor inducing the atrophy. In cachectic conditions NF- κ B is activated via TNF- α pathway, yet in disuse atrophy TNF- α is not involved. The pathways leading to muscle atrophy during osteoporosis is not defined yet.

In this project the skeletal muscles of ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoporosis were analyzed for functional and structural alterations. After defining atrophy in muscle immunohistochemical and gene expression analyses were carried out and pathways leading to disease were studied.

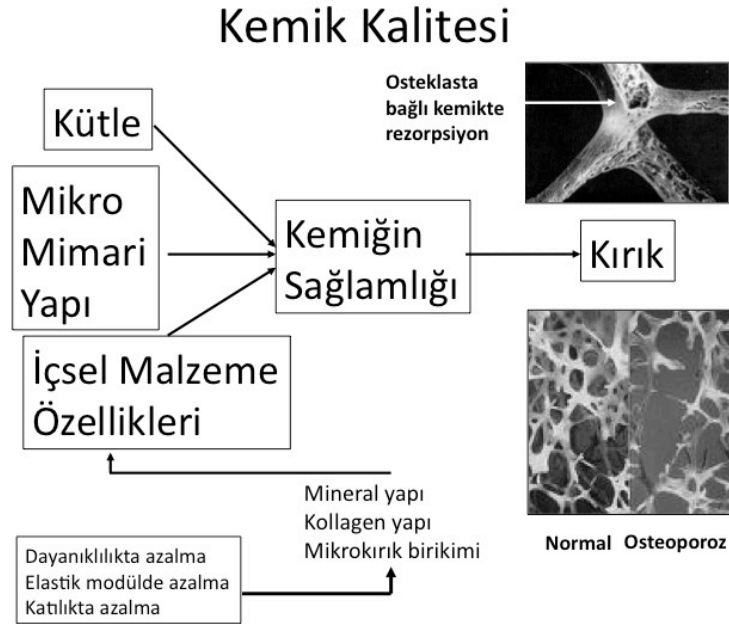
In this study splitting and size variations of fibers, central nuclei and well-preserved overall ultrastructure were noted in the ovariectomized (OVX) and the ovariectomized+*infiximab* injected (OVX-TNF) groups. Slow-twitch Type I fiber percentage, areas and diameters increased in EDL muscles of the OVX and the OVX-TNF group comparing to the control group. The p65 molecule which is known to increase in cachectic atrophy but not in disuse atrophy was shown to increase in expression and localize to nucleus in OVX group compared to the control. Bcl3 and C-Rel molecules which are known to increase in disuse atrophy pathway were shown to have no difference between the groups.

To sum up, TNF- α has a role in skeletal muscle dysfunction in OVX rats, the atrophy occurring after OVX proceeds by TNF- α related cachectic pathway, and TNF- α antagonist administration recovers the functional loss. But this modulation was not sufficient for total structural recovery. Infiximab injection is somehow efficient in decreasing the effects on skeletal muscle after ovariectomy, yet this treatment is not totally enough for recovering the structural changes.

Keywords: Osteoporosis, skeletal muscle, atrophy, TNF- α , ovariectomy

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) osteoporozu bir insanda yüksek kırık riskine yol açacak derecede bozulan kemik gücü kaybıyla tanımlar. Bu hastalıkta kemik mineral yoğunluğunda (KMY) düşme ve mikro yapıda bozukluk sonucu kemik kalitesi düşer ve kendiliğinden (spontan) kırık oluşur (Şekil 1). Osteoporoz ülkemizde ve tüm dünyada 75 milyondan fazla kişiyi etkileyen önemli bir metabolik kemik hastalığıdır. Yaşlanan dünya nüfusu nedeniyle osteoporoz anlamlılığı giderek artan dünya çapında bir sağlık sorunudur ve genellikle sessiz epidemik bir hastalık olarak adlandırılır (INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2002). Sağlıklı yaşlanma ve osteoporoz, ulusal ve uluslararası öncelik gösteren sağlık konularının başında gelir. Osteoporoz ile birlikte kas iskelet hastalıklarına dikkati çekmek üzere 2000 yılında İsveç’de Kas-İskelet 10 Yılı Hareketi başlatılmış olup (<http://www.boneandjointdecade.org/>) konunun önemi nedeniyle ülkemiz dahil pek çok ülkede kamuyu bilgilendirici bu hareketin önümüzdeki 10 yılda da sürdürülmesine karar verilmiştir. Osteoporoz OECD ile WHO’nun öncelikli araştırma konuları arasında da yer almaktadır (<http://www.who.int/topics/ageing/en>). Proje bu bağlamda sistemik bir bakış açısı getirerek geniş bir çerçevede osteoporozun iskelet kası üzerindeki yapısal etkisini moleküler boyutta ele almıştır.



Şekil 1. Kemik kalitesi.

Osteoporoz genellikle 50 yaş üzeri kadınlarda menapoz sonrası östrojen salgılanmasının durmasıyla birlikte kendini gösterir (RAISZ, 2005). Buna menapoz sonrası (postmenapozal) osteoporoz denir. Östrojen yumurtalıklar tarafından üretilen bir steroid hormondur ve normalde KMY'nu arttırarak kemik kırığı riskini azaltmaktadır (LINDSAY, 2004). Elli yaşın üstündeki kadınların üçte birinde ve erkeklerin beşte birinde gözlenen osteoporoz özellikle ileri yaşlarda küçük bir düşme sonrasında el bileği, omurga ve kalça kırıklarına neden olmaktadır. Osteoporotik kırık sonrası morbidite ve mortalite çok yüksektir (NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2010). Osteoporotik kırık nedeniyle doğru zamanda uygun tedaviyi gören hastaların bile yarısı eski yaşam kalitelerine dönememekte ve bağımsızlıklarını yitirmektedir. Yatağa bağlı kalan bu hastalar ev içi işlerini destekle görmekte ve hareket zorluğu nedeniyle çoğunlukla bir bakıcıdan destek alma durumunda kalmaktadır. Osteoporotik kalça kırığı nedeniyle cerrahi geçiren 4 hastadan biri ise 2 yıllık izlemde yaşamını yitirmektedir (UÇAN, 2006) (Şekil 2). Bu bağlamda osteoporoz nedenli kalça kırıkları uterus, over ve serviks kanserlerinin hepsinin toplamının neden olduğu ölüm oranından daha çok ölüme neden olmaktadır (PARVEZ, 2004). Hastalığın küresel olarak maliyeti Uluslararası Osteoporoz Vakfı (IOF) tahminlerine göre 2050 yılında 106 milyar Euro'yu bulacaktır.

Osteoporozun Önemi



(www.osteofound.org)

- **50+ kadınların %40'ında osteoporozla bağlı en az bir kırık görülecektir.**

- 1990 yılında osteoporozla bağlı 1.7 milyon kalça ameliyatı gerçekleştirilmiştir.

- Bu sayının 2050 yılında 6 milyon'a çıkması beklenmektedir.

- Sakat kalma olasılığı %50.
- Ölüm olasılığı %25.



Osteklasta bağlı kemikte rezorpsiyon

Şekil 2. Osteoporozun önemi.

GENEL BİLGİLER

Kemirgenlere ovariyektomi (cerrahi yöntemle yumurtalıkların çıkarılması) (OVX) uygulanarak araştırmalarda kullanılmak üzere postmenapozal osteoporozu örnekleyen hayvan modeli elde edilir. Ovariyektomi gerçekleştirilmiş sıçan modeli bu araştırmalar için sıklıkla kullanılır (TURNER, 2001). Osteoporoz tanısı, WHO'nun da önerdiği tanı yöntemi olan çift enerjili X-ışını absorptiometresiyle (DXA) KMY ölçümü yapılarak gerçekleştirilir. Ovariyektomi sonrası sıçanların süngerimsi kemiklerinde bölgesel olarak kemik kütlesi ve gücü kaybı gözlenmiştir (WRONSKI, 1986). Bu değişiklikler insanda menapoz sonrası değişimleri örnekler. Ayrıca farelerde uygulanamayan osteoporoz oluşumunu kanıtlayan KMY ölçümü sistemi olan DXA sıçanlarda kullanılır (JEE, 2001). Osteoporoz oluşumunu gözlemek için yaşı 6 ay ve üzeri olan sıçanların kullanılması önerilir (COMPSTON, 2009). Kemik mineral yoğunluğu ölçümü femur ve omurgada bilgisayar ortamında yapılır.

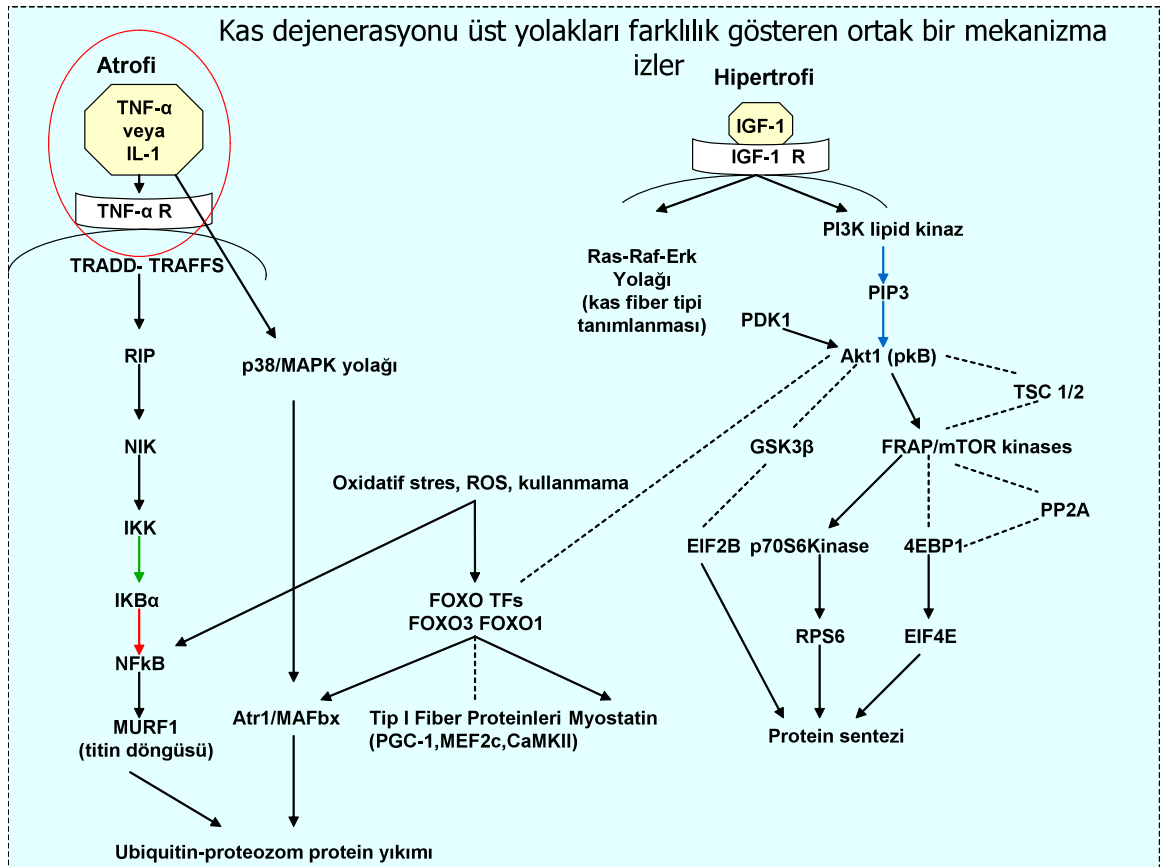
Osteoporoz yaygın bir kemik hastalığıdır ve güncel klinik görüşe göre kemik hastalıklarının değerlendirilmesinde kas dokusu da mutlaka ele alınmalıdır (SCHÖNAU, 2006). Wolff kanunu (WOLFF, 1982) kemiklerin mekanik yüke yapım yönünde yanıt verdiğini belirtir. Frost bu teoriyi daha da geliştirerek bir mekanostat sistemi teorisi geliştirmiştir (FROST, 1998; SCHÖNAU, 2006). Bu teoriye göre kemik osteoklast ve osteoblastlar üzerinden fiziksel ve mekanik kuvvetlere yeniden şekillenerek yanıt verir. Gerçekleştirilen bir araştırma (TAKATA, 2001) kemikteki mekanik uyarı azlığının kemik yapımını azalttığı ve kemik yıkımını arttırdığını göstermiştir. Osteoporoz çalışmalarında genellikle kemik yapısına ve işlevine odaklanırken kas-iskelet sisteminin bir parçası olan ve kemiği mekanik olarak uyaran kaslara dair çok az sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu projede iskelet kasında OVX sonrası yapısal ve moleküler değişiklikler incelenmiştir.

İnsanda ve deneysel çalışmalarda osteoporozla bağlı kas atrofisi tanımlanmıştır (HEIKKINEN, 1997; FISCHER, 1998; MORAN, 2006). Kas yıkımı olarak kendini gösteren kas atrofisi kas gücünde azalmaya neden olur. Çoğu kas atrofisinde protein sentezi azalmış ve genel olarak protein yıkım oranı artmıştır. Bu protein metabolizması osteoporozda görülen hızlı kas kaybını açıklar (LECKER, 1999).

Postmenapozal kadınlarda kas gücünde azalma daha önce gösterilmiştir (HEIKKINEN, 1997). Dışarıdan östrojen verilmesi bu etkileri OVX sıçanlarda azaltır (SCALLON, 1995). Atrofinin düzelmesini takiben kas lifi büyümesi, yeniden oluşması ve hücredışı matriksinde yenilenme görölmüştür (MCCLUNG, 2006). Yapılan alışmalarda OVX sıçanlarda ekstensör kas atrofisinin daha belirgin olduğu ve kasılma zamanlarında azalma olduğu bildirilmiştir (FISHER, 1998). Ovariyektomi ayrıca sıçanların ekstensör digitorum

longus (EDL) ve soleus (SOL) kaslarında kuvvetin azalmasına ve aktin-miyozin etkileşiminde bozulmaya neden olmuştur (MORAN, 2006). Ayrıca kullanılmama atrofisini takiben verilen östrojenin myofibril oluşumunu ve hücre dışı matris yenilenmesini arttırdığı gösterilmiştir (MCCLUNG, 2006). Ovariyektomili sıçanlarda gözlenen işlev kaybının kalsiyum metabolizmasına bağlı olmadığı, SOL kaslarında %20 işlev kaybı olmasına karşın izometrik kasılmada kalsiyum duyarlığında bir değişim olmadığı vurgulanmıştır (WATTANAPERMPPOOL, 1999). Atrofi ayrıca yaşlanması hızlandırılmış osteoporotik sıçan modelinde de gözlenmiştir (CHEN, 2006). Ancak bu kas yıkımının moleküler yollarına dair bir çalışma yürütülmemiştir.

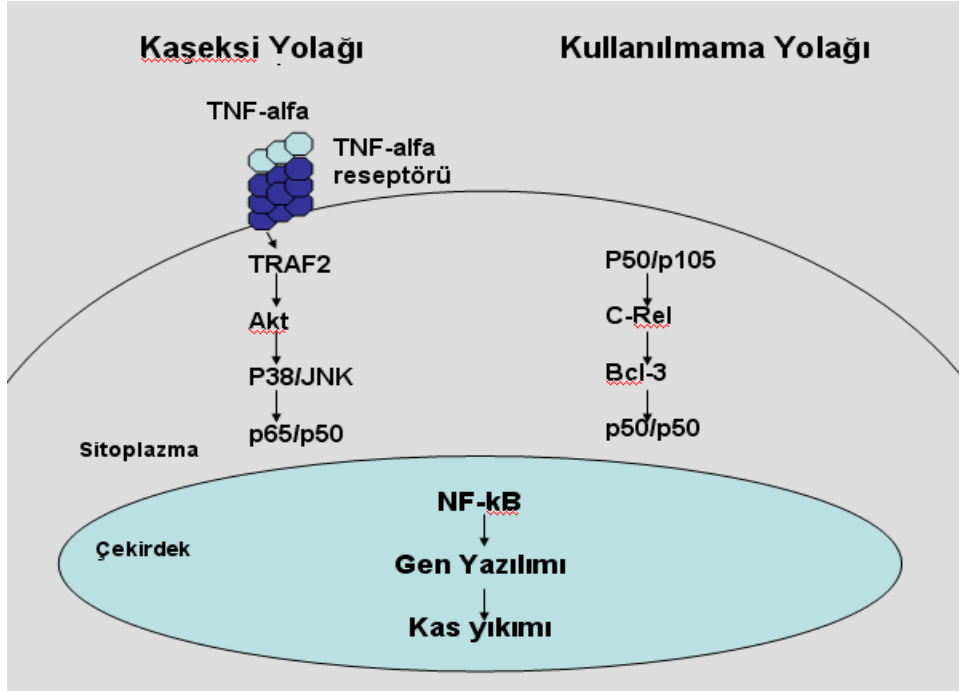
Kas atrofisinin moleküler alt yolları kabaca bilinmekle birlikte atrofisinin asıl olarak iki ayrı üst yolakla tetiklendiği varsayılmaktadır (Şekil 3). Bunlardan biri "*kullanılmama atrofisi*", diğeri de "*kaşektik atrofi*"dir. Atrofi kullanılmama veya hareketsizlik nedeniyle yaşlılığa bağlı olarak durağan yaşam tarzından kaynaklanabildiği gibi hastalık nedeniyle ortaya çıkan bağışıklık sistemi uyaralarıyla da kaşektik atrofi gelişir. Her iki durumda nedenler ve üst yollar farklılık gösterse de iskelet kası ortak bir ubiquitin-proteozom yolağıyla yıkıma gider (HUNTER, 2002).



Şekil 3: İskelet kası atrofisi ve hipertrofisi yolları.

Kaşektin adıyla da anılan TNF-alfa, iskelet kası yıkımında görev alan nükleer faktör kappa-beta (NF-kB) yıkım yolağını uyararak bir sitokindir. TNF-alfanın sadece kaşektik atrofi yolağında rol aldığı düşünülür (HUNTER, 2002; HUNTER, 2004; ZHANG, 2007; FRENETTE, 2000). Buna karşın kullanmama atrofisinde TNF-alfanın rolü henüz gösterilememiştir. TNF-alfa NFkB yolağını uyararak iskelet kası atrofisine ve apoptoza yol açan önemli bir etmendir (GHOSH, 1998; GUTTRIDGE, 2000). Remicade (*Infliximab*), günümüzde ilaç olarak kullanılan bir TNF-alfa antagonistidir (KNIGHT, 1993; SCALLON, 1995).

Kaşektik ve kullanılmama atrofi yollarında farklı proteinlerin ekspresyonu ön plandadır (Şekil 4). Yapılan bir çalışmada (HUNTER, 2004) kullanmama atrofisi NFkB yolağını p50, cRel, Bcl3 gibi proteinlerin ekspresyonundaki artışla uyarırken p65 proteinini ekspresyonunda farklılık görülmemiş, kaşeksiseyde sadece p65 ve p50 proteinlerinde artış izlenmiştir.



Şekil 4: Kas yıkımında kaşeksi ve kullanılmama atrofisinin yolları.

Daha önceki çalışmalarda (CARSON, 2002; STEVENSON, 2003) kullanılmama atrofisinin ve kas hipertorfisinin gen çipi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda enerji, yıkım ve yağ depolanmasını ilgilendiren çeşitli genlerin ekspresyonunda 2 katına varan artışlar gözlenmiştir. Ubikitin-proteozom yolağındaki genlerin etkinleşmesi bize bu koşullardaki kaslarda gerçekleşen değişiklikler hakkında önemli bilgiler verir.

Yavaş kasılan SOL ve hızlı kasılan EDL kaslarında yapılan karşılaştırmalı bir çalışma (MORAN, 2006) menapoza giren farelerde EDL kaslarının yavaş kasılan Tip 1 lif oranını

arttırdığını SOL kaslarınıninsa atrofiye daha çok uğradığını göstermiştir. Bu sonuç kas lifi tipi değişiminin hızlı kaslarda daha belirgin olduğunu ancak yavaş kasların daha fazla atrofiye uğradığını gösterir. Başka bir çalışma (FISHER, 1998) OVX'in bütün organlarda kütle artışına sebep olduğunu ancak bunun lipid metabolizmasındaki değişimle ilgili olduğunu, bütün organları etkilediğini ve özellikle kas hipertrofisine işaret etmediğini vurgulamıştır.

Yetişkin osteoporotik sıçanlarda iskelet kası atrofisinin kaşektik veya kullanılmama atrofisi yollarından birinin üzerinden gelişmesi beklenir. Kullanılmama atrofisinde inflamatuvar kaşektik moleküller rol oynar. Eğer OVX sıçanlarda gelişen iskelet kası atrofisinin TNF-alfa yolağı üzerinden inflamatuvar moleküllerle ilerlediği varsayılırsa osteoporotik hastalarda atrofinin sadece kullanılmamaya ve fiziksel etkinlik azlığına bağlı olarak oluşmadığı ve bir inflamatuvar hastalık yolağını izlediği düşünülebilir.

Bu çalışmada inflamatuvar kaşektik yolağı engellemek amacıyla kaşeksiyi etkinleştiren molekül olan TNF-alfa antagonisti sıçanlara uygulanmıştır. TNF-alfa, NF-KB yolağını uyararak bu yolaktaki molekülleri çekirdeğe doğru yönlendirmektedir (GUTTRIDGE, 2000). TNF-alfa'nın iskelet kası oluşumunu engellediği ve iskelet kası apoptozunu tetiklediği gösterilmiştir (GUTTRIDGE, 2000; LANGEN, 2001; GROUNDS 2004). Romatid artirit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan TNF-alfa antagonisti içerikli çeşitli ilaçlar bulunmaktadır. *Infliximab* TNF-alfa antagonisti olarak kullanılan bir monoklonal antikordur. Remicade (Schering-Plough) aktif madde olarak *infliximab* içermektedir (KNIGHT, 1993; SCALLON, 1995). Remicade serumdaki serbest ve hücre üstündeki TNF-alfa'yı aynı anda bloke eder. *Infliximab*'ın distrofik kastaki olumlu etkisi daha önce de gösterilmiştir (GROUNDS, 2004).

Bu projenin ön çalışması olarak gerçekleştirdiğimiz deneylerde OVX uyguladığımız sıçanlarda kas gücü kaybına rastladık (DAĞDEVİREN, 2011). Bu kas gücü kaybının moleküler düzeyde etmenlerini incelemek ve daha önce tanımlanan kas atrofisinin hangi 2 yoldan birinde geliştiğini anlamak için TNF-alfa molekülü antagonisti olan *infliximab*'dan yararlandık. Ön çalışmamızda TNF-alfa antagonisti *infliximab* enjeksiyonunun kas gücü azalmasını önlemede etkili olduğunu gördük.

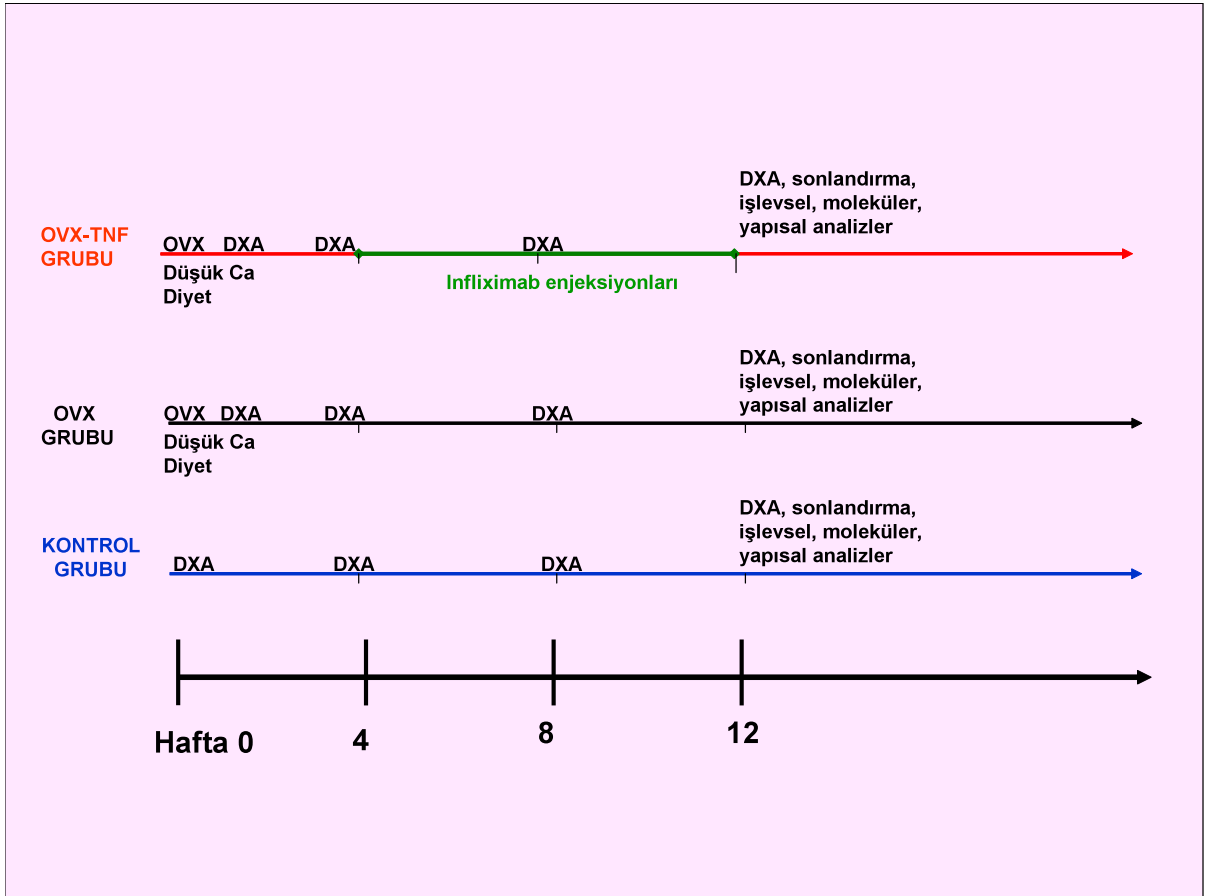
Bu projenin **amaçları** bu bilgilerin ışığında şöyle belirlendi:

1. Güç kaybı gösteren OVX sıçanların iskelet kaslarında oluşan yapısal değişiklikleri ışık ve elektron mikroskopi yöntemleri ile göstermek,
2. OVX sıçanların iskelet kaslarında TNF-alfa yolağında farklılık gösteren atrofik proteinlerin hücresel yerleşimini ve ekspresyonunu immünohistokimyasal yöntemlerle belirlemek,
3. TNF-alfa antagonisti *infliximab* uygulanmış OVX sıçanların iskelet kasında oluşan değişiklikleri ışık ve elektron mikroskopi yöntemleriyle değerlendirmek ve
4. TNF-alfa antagonisti *infliximab* uygulanmış ve uygulanmamış OVX sıçanlarda oluşan değişikliklerin aday genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını inceleyerek iskelet kası gücündeki değişikliği incelemek.

Çalışma kapsamında menapoz sonrası kas gücü kaybının ve bu kaybın engellenmesi amacıyla kullanılan TNF-alfa antagonisti infliximab'ın etkileri yapısal ve moleküler düzeyde araştırılmıştır. Bu bilgilerin osteoporoz tedavisine daha geniş ve sistemik bir bakış açısı getirmesi ve yeni bilimsel çalışmalara temel oluşturması hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Disiplinlerarası, randomize kontrollü, ileriye yönelik ve uzunlamasına tasarlanan "Osteoporotik Sıçan Dokularında İskelet Kası Atrofisinin İmmünohistoloji ve Moleküler Biyoloji Yöntemleriyle Araştırılması" başlıklı projemizin bağımlı değişkenleri Gruplar (n=3) ve Zaman (n=1) olarak belirlenmiştir. Çalışmanın başlangıcında kontrol grubunun dışındaki iki grupta KMY, DXA cihazı ile ölçülmüş ve OVX gerçekleştirilmiştir. Düşük kalsiyumlu diyetle beslenen sıçanların 4 haftanın sonunda KMY'ü bir kez daha DXA ile ölçülerek sonuçlar uzunlamasına incelenmiş ve bir gruba infliximab verilmiştir. OVX sonrası 12. haftada deney sonlandırılırken bağımlı değişkenler olan (a) DXA ile KMY, (b) işlevsel analiz, (c) yapısal değişiklikler ve (d) moleküler değişiklikler iskelet kası örnekleri alınarak incelenmiştir (Şekil 5).



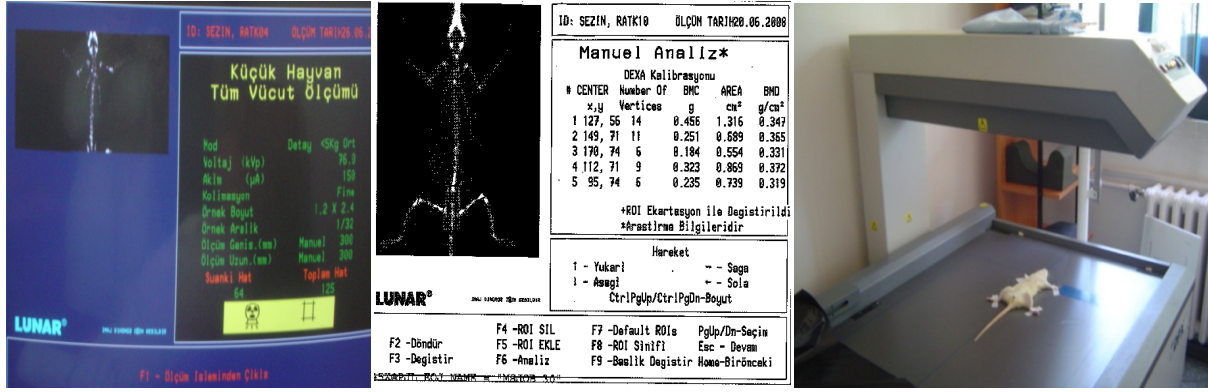
Şekil 5: Çalışma tasarımı.

Her grupta 10 sıçan bulunmaktadır. Sıçanların deneye dahil edilme ölçütü radyolojide kemik deformitesinin olmaması ve OVX sonrası uterus ağırlığında azalma ile KMY'da düşme olarak belirlenmiştir. Bu ölçütler doğrultusunda sıçanların tüm vücut radyografileri çekilmiş, KMY'lukları ve uterus ağırlıkları ölçülmüştür. Radyografi için, ODTÜ Sağlık ve Rehberlik Merkezi Radyodiagnostik Ünitesinde bulunan Siemens, Multix-C röntgen makinesi (Münih, Almanya) kullanılmıştır. Ölçümden önce anestezi için deneklere 90mg/kg ketamin uygulanmıştır. İki yönlü ekstremite grafileri 41 kV ve 2 mAs/s de elde edilmiştir. Işın tüpünün kemik örneklerine mesafesi 100 cm olarak sabitlenmiştir. Deneylerde Agfa Crurix röntgen filmi ve Agfa Crurix 60 otomatik banyo cihazı kullanılmıştır. Röntgen ile olası kemik deformitesi incelenmiş olup sıçanların hiçbirisinde deneyi engelleyecek radyolojik patoloji saptanmamış ve hepsi deneye dahil edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6: Sıçanların tüm vücut radyografisine bir örnek.

Kemik mineral yoğunluğu ölçümlerinde ODTÜ Sağlık ve Rehberlik Merkezi Radyodiagnostik Ünitesinde bulunan Lunar DPX (Lunar Radiation Corp., Madison, ABD) DXA cihazı kullanılmıştır. Ölçümden önce anestezi için deneklere 90mg/kg ketamin uygulanmıştır. Bu cihazda küçük hayvan yazılımı bulunmakta olup ölçüm modu 140/70 kVp, 2.0 mA ve 60 Hz olarak belirlenmiştir (Şekil 7). DXA ölçümleri sonucu OVX geçiren 2. ve 3. grup hayvanlarda 8 hafta sonunda KMY kaybı gözlenmiştir (Tablo 1).



Şekil 7: Sıçanların kemik mineral yoğunluğunun DXA cihazı ile ölçülmesi.

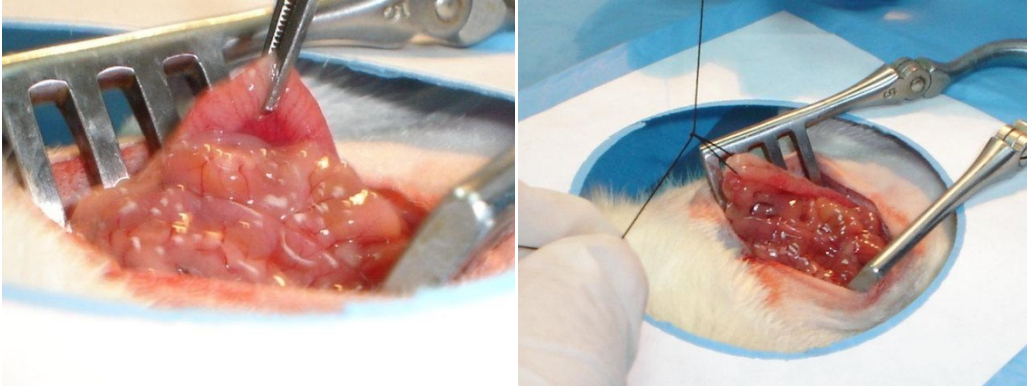
Tablo 1. Ovariyektomi öncesi ve sonrası sol femur KMY'ları g/cm³ (Ortalama±Standart Sapma) olarak verilmiştir. Ovariyektomi ve OVX+TNF alfa gruplarında OVX sonrası 12. haftada KMY'nun istatistiksel olarak (p>0.05; Tek Yönlü Varyans Analizi-Post Hoc testi) anlamlı şekilde düştüğü belirlenmiştir.

	Kontrol	OVX	OVX+TNF
OVX Öncesi	336± 8.9	349± 7.4	351 ± 9.9
OVX Sonrası 12. Hafta	368± 7.4	345± 7.0*	340± 6.7 [†]

Deneyler 7,5 aylık yaşlı dişi Sprague Dawley sıçanlarda gerçekleştirildi. Her gruba rastgele 10 sıçan atandı. Grup 1 OVX geçirmemiş (kontrol grubu) sıçanlardan, Grup 2 ve 3 OVX ve düşük kalsiyumlu diyetle osteoporoz oluşturulmuş sıçanlardan oluşturuldu. Düşük kalsiyumlu sıçan yemi Bil Yem, Ankara, Türkiye firmasına özel siparişle ürettirildi. Grup 3 sıçanlara TNF-alfa antagonisti 8 hafta boyunca 2.5mg/hafta/hayvan (1ml si 10 mg *influximab* içeren izotonik çözelti içerisinde, Remicade, Schering-Plough (Brinniy) Co., Innishanon, County Cork, İrlanda) dozunda intraperitoneal uygulandı.

Cerrahi sonrasında sıçanların serbest hareketine izin verildi. Her gün 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık dönemlerde izlenen sıçanlar diledikleri kadar su tüketti. Deney süresinin sonunda sıçanların yaşamları CO inhalasyonu ile sonlandırıldı ve iskelet kası dokuları incelenmek üzere alındı. SOL ve EDL kas örnekleri incelemelerde kullanılmak üzere cerrahi olarak çıkartıldı. Hayvan deneyleri ve hayvanların bu süreçteki bakımı Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında etik kurul izni (14.05.2008-2008/7/40-8) alınarak gerçekleştirildi. Tüm uygulamalarda Veteriner Deontoloji Kanununun 6343/2 maddesi ve Helsinki Hayvan Hakları Bildirgesine bağlı kalındı.

Ovariyektomi genel anestezi (Ketamin: Alfamine %10, Alfasan International, Hollanda, 0.2 ml/denek ve Ksilazin Alfazyne %2, Alfasan International, Hollanda, 0.1 ml/denek) altında gerçekleştirildi. Enfeksiyon oluşumunu önleyebilmek için cerrahi işlem sırasında kas içine tek doz 25 mg/kg Sefazolin (Cefozin Bilim İlaç San, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Cerrahi işlem sonrası ağrının azaltılması için işlemin bitiminde kas içine tek doz 20 mg/kg Fenilbutazon (Devaljin, Deva İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Cerrahi yerinin kapatılması sonrasında bakteriyel kontaminasyonu önlemek için yara yerinin üzeri sprey-film (Opsite Spray, Interfarma, İstanbul, Türkiye) ile örtüldü (Şekil 8).

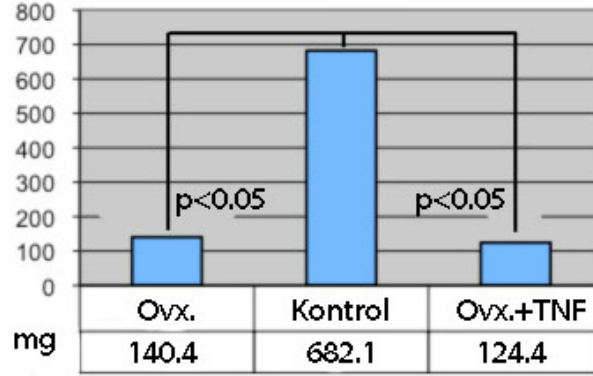


Şekil 8: Ovariyektomi ile yumurtalık tüplerinin bulunması ve bağlanması.

Sonlandırılan sıçanların uterusları cerrahi yöntemlerle çıkarıldı ve ağırlıkları milligram değerinde hassas terazi kullanılarak ölçüldü. Ovariyektomi sonrası uterus ağırlıklarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yaklaşık 5 kat ağırlık kaybı ve atrofi belirlendi (Şekil 9 ve 10).



Şekil 9: Ovariyektomiden 12 hafta sonra atrofik uterus.



Şekil 10: Uterus ağırlıkları.

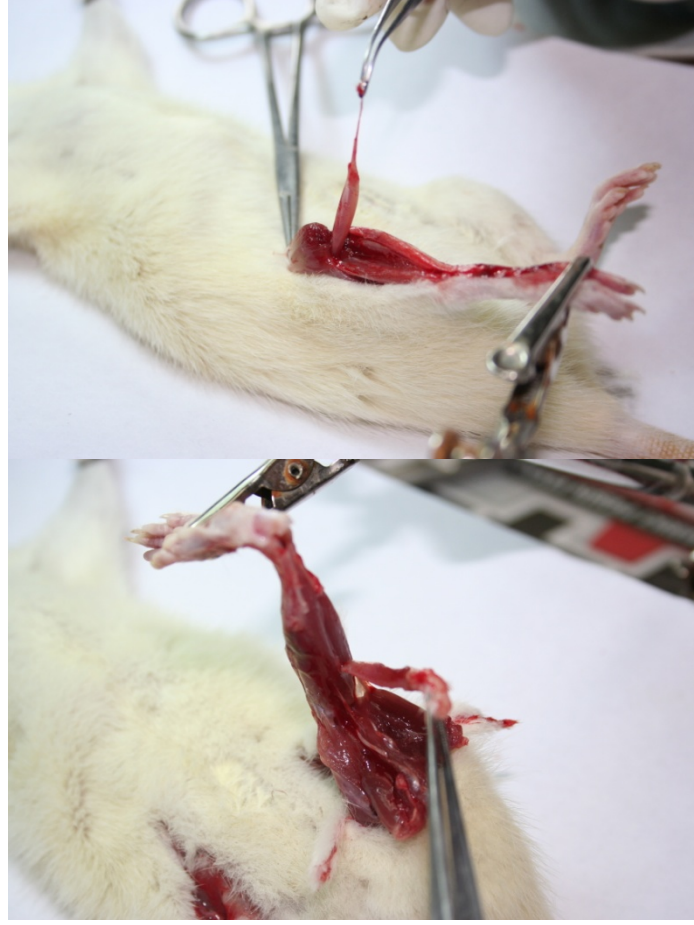
Çalışmanın hipotezleri "(1) ovariyektomi sonrası sıçanlarda iskelet kası atrofisi ve yapısal bozukluk gelişecek, (2) bu kaslarda işlev bozukluğu görülecek, (3) atrofinin TNF alfa moleküler üst yolağını kullanıp kullanmadığı immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemlerle araştırılacak ve (4) bu üst yolağın NF-kappaB alt sinyal yolağını tetkileyip tetiklemediği betimlenecektir." şeklinde proje başvurusu aşamasında belirtilmiştir.

Bu doğrultuda çalışmanın bağımlı değişkenleri: (1) OVX sıçanlarda kasta atrofi ve yapısal bozukluğun gelişip gelişmediğinin ışık ve elektronmikroskopiyle (hücrelerdeki TNF yolağında etkili moleküller ve yıkım proteinlerine ait immünreaksiyonun şiddeti iki gözlemci tarafından histolojide bağımsız olarak derecelendirildikten sonra ortak değerler esas alınarak dijital ortamda kantitatif olarak) değerlendirilmesi, (2) işlev bozukluğunun ortaya konması için ışık ve elektronmikroskopi verilerinin yanısıra mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizlerinden yararlanılması, (3) iskelet kaslarının ışık mikroskopuyla uygun histokimyasal yöntemler kullanılarak morfolojisinin incelenerek tip 1 ve tip 2 kas lifi baskınlığının dijital ortamda kantitatif olarak hesaplanması ve (4) gen ekspresyonu analizleri için NfkappaB yolağı mRNA düzeyinde (TNF-alfa-IKK-IKBalfa-NF-kappaB-MURF1, MAFbx1 yolağı genleri, p50/CREI/Bcl3-NF-kappaB ve p50/p65-NfkappaB yolağı genlerini esas alarak) incelenmesi olarak belirlenmiştir.

Çalışmada:

- (1) Işık mikroskobu için izleme alınmış SOL ve EDL kaslarında rutin boyamalar ve kas lifi tipine özgün boyamalar gerçekleştirildi ve değerlendirildi,
- (2) Elektron mikroskopu için dokular izleme alındı ve ince yapı incelemeleri gerçekleştirildi,
- (3) İmmünohistokimyasal işaretleme gerçekleştirildi, immün boyanmalar incelendi ve dijital ortamda kantitatif olarak değerlendirildi ve
- (4) Gen ekspresyon analizi için mRNA izolasyonu yapıldı ve gen ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

I-ışık mikroskopi: Deneye başlanmadan önce genel anestezi (Ketamin/Ksilazin: 80/8 mg/kg Alfamine %10, Alfasan International, Hollanda, 0.2 ml/denek ve Ksilazin Alfazyne %2, Alfasan International, Hollanda, 0.1 ml/denek) altında uygun cerrahi yöntemle EDL ve SOL kasları izole edildi (Şekil 11). Doku örnekleri ışık mikroskobu için fosfat tamponu (PBS) içinde hazırlanmış % 10'luk formalin çözeltisinde tespit edildi. Formalin çözeltide tespit edilen doku örnekleri dereceli alkollerde dehidrate edildikten sonra parafine gömüldü. Dokuların izlemi için sabit vakumlu bir doku izlem cihazı (Leica, model 1150, Almanya) kullanıldı. NADHTR boyaması için dokular -196°C sıvı azotta saklandı.



Şekil 11: EDL ve SOL kaslarının izolasyonu.

Parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen eozin (HE) ve trikrom boyamalar yapıldı. Kesitler ışık mikroskopu altında 200x ve 400x büyütmeyle incelendi.

NADH-TR boyası için 7-10 mikrometre kalınlığındaki donmuş kesitler NADPH boya çözeltisinde (10ml Gomori Tri HCl: 10mg nitroblue tetrazolium: 5mg beta-nicotinamide adenine dinucleotide) 30 dakika 37°C de inkübe edildi. Kesitler inkübasyondan sonra distile su ve 90% asetonla yıkandı. Hazırlanan örnekler gliserol ile kapatıldı ve 4°C de sayıma kadar saklandı. Lecia DC500 dijital kamerayla (Almanya) 200x büyütmede dijital görüntüler elde edildi. Lif tipi skorlaması için sayısal analiz Leica Qwin Plus bilgisayar görüntü analiz sisteminde (DERAVE, 2005; STASSIJINS, 1998; GEYİKOĞLU, 2007) gerçekleştirildi. Koyu boyanan Tip 1 ve açık boyanan Tip 2 kas liflerinin çapları ve kesit alanları bilgisayarda Qwin Leica marka görüntü analiz programında ölçüldü. Ölçüm her kesitte en az 100 lifte gerçekleştirildi.

II-Elektron Mikrosopi: Elektron mikroskopi için %2 gluteraldehitte 2 saat boyunca +4 C⁰ de tespit edilen dokular için ikinci fiksasyon %1'lik osmium tetroksit içinde 90 dakika bekletilerek yapıldı. Dokular Sorenson tampon solüsyonu ile 3-4 defa değiştirilerek yıkanarak dehidratasyonu sağlamak için sırayla %50, %60, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden geçirildi. Doku örnekleri propilen oksit ile iki defa 15 dakika yıkanarak çeşitli ölçülerde plastik propilen oksit karışımlarıyla alıştırıldıktan sonra dörtlü plastik karışımla bloklanarak 60°C de 48 saat polimerize edildi. Piramidomda alınan yarı ince kesitler %1 lik boraks içindeki %1'lik metilen mavisi-Azur II karışımında boyandıktan sonra gümüş rengi ince kesitler ultramikrotomda cam bıçakla alınarak bakır gridler üzerine toplanıp uranil asetat ve Reynold solüsyonu ile boyandı. Örnekler Zeiss ve Jeol marka elektron mikroskoplarda incelendi.

III- İmmünohistokimya: Çalışmada kullanılacak farklı işaretleyici antikörlerin farklı çalışma protokollerine uygun olarak kas örneklerinin bir bölümü immunohistokimyasal inceleme için sıvı azotta hızla donduruldu. Donmuş doku örnekleri sıvı nitrojende kesit alınana kadar saklandı. Beş-yedi mikrometre kalınlığında kriyomikrotom kesitleri adezif poly-L-lysin kaplı elektrostatik lamlara alındı ve bir gece nemsiz kutularda bekletilerek ertesi gün immün işaretleme işlemi uygulandı. Kesitler 4°C de asetonda 10 dakika fikse edildi ve yarım saat kurutuldu. Anti-mouse ve anti-rabbit HRP-DAB boya kitleri (CTS002, CTS005 R&D, Minneapolis, ABD) protokole uygun olarak kullanıldı. Özgün olmayan boyanmalar rat serumu blokajıyla (1:10 seyreltme 30 dk, oda sıcaklığı) engellendi. Kesitler nemli küvette oda sıcaklığında Tablo 2 deki monoklonal antikörlerle 1 saat inkübe edildi.

Tablo 2: Primer monoklonal antikorlar.

Antikor	Klon	İzotip	Katalog No	Kaynak	Seyreltme
NFκB p50	NLS	Rabbit IgG	Sc-114	Santa Cruz	1:20
NFκB p65	F-6	Mouse IgG ₁	Sc-8008	Santa Cruz	1:20
C-rel	B-6	Mouse IgG1	Sc-6955	Santa Cruz	1:20
Bcl3	H-146	Rabbit IgG	Sc-13038	Santa Cruz	1:20
MyoD	5.8A	Mouse IgG1	Sc-32758	Santa Cruz	1:20

Primer antikor uygulandıktan sonra kesitler 0,01 M pH 7.4 PBS ile yıkanıp biyotinli anti-mouse veya anti-rabbit sekonder antikorlarla 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Yıkmadan sonra lamlar HSS-HRPyle 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidrokloritle (DAB) ile 2 dakika kadar önerilen protokol uyarınca inkübe edildi. Suyla yıkandıktan sonra kesitler Mayer hematoksilenle boyandı, derecelendirilmiş alkollerle tespit edildikten sonra ksilden temizlendi ve Entellan (Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı. İmmüno floresan boyamalar içinse primer antikorla inkübasyondan sonra PBS ile 3 kere 5 dk yıkama yapıldı. Anti-mouse veya anti-rabbit FITC konjuge sekonder antikorlarla (Alexa flour 488, 546 Molecular Probes, ABD) oda sıcaklığında 30 dk inkübasyon uygulandı. Bu kesitler PBS ile 3 kere 5 dakika tekrar yıkandı, DAPI çekirdek boyasıyla (D9542, Sigma, Almanya) boyandı ve floresan kapama solüsyonuyla (#S3025, Dako, Danimarka) kapatıldı. Bütün antikorlar 0.05 M % 0.1 Tween 20 içeren TrisHCl den oluşan arka plan boyanmasını azaltıcı solüsyonla seyreltildi. Negatif kontrol boyamaları için primer antikor koyulmadı ve bir kontrol fare IgG si kullanıldı. Pozitif kontrol için üretici tarafından önerilen uygun kontrol dokusu kullanıldı. Bütün kesitler Leica DM6000B (Wetzlar, Almanya) cihazıyla incelendi ve DC490 dijital kamera (Leica, Wetzlar, Almanya) ile fotoğraflandı. Sayısal analiz Lecia Application Suite ve Qwin Plus Quantitative (Wetzlar, Almanya) görüntü analiz sistemiyle literatürden uyarlanarak (UĞUR, 2003; DOĞRU, 2010) gerçekleştirildi. Maksimum boyanma şiddeti pozitif kontrol dokularına göre görüntü analiz sistemi kullanarak hesaplandı. Her EDL ve SOL kası buna göre hücrel immün reaksiyon için DAB yardımıyla 0 dan 3'e kadar skorlandı. 0 hiç immün reaksiyon olmamasını, 1 az ama devamlı bir reaksiyonu, 2 ortalama ama devamlı bir reaksiyonu 3 de şiddetli ama devamlı bir immün reaksiyonu ifade etmektedir. İmmün pozitif hücrelerin sayısı pozitif hücre/toplam hücre oranı olarak 200x büyütmede hesaplandı. Her kesitte ortalama 3 kesişmeyen alan incelendi. Boyanma şiddeti boyanmış hücrelerin

şiddetiyle birleştirilip aşağıdaki formüle göre H-SKOR hesaplaması yapıldı. H SKOR üzerinden gruplar arası istatistiksel farklılık belirlendi.

$H\ SKOR = \sum \rho (i+1)$, $i = 0$ dan 3 e kadar boyanma şiddeti skoru, ρ 1-100 arası pozitif hücre oranı, Σ : Farklı şiddetlerde boyanmış hücrelerin toplamı.

IV- Gen ifade analizi (RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi):

Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Çözeltiler

RNA İzolasyonu

Trizol (Invitrogen)
Kloroform (Applichem)
İzopropanol (Applichem)
Dietil pirokarbonat (DEPC, Applichem)
Etanol (Riedel)

cDNA Sentezi

ImProm-II™ tamponu (Promega) (5X) (Promega)	Tris-HCL KCL DTT	250 mM 250 mM 50 mM
ImProm-II™ RT (Promega)	1 µl/ reaksiyon	
MgCl ₂ (Promega)	25 mM	
Oligo(dT) ₁₅ primeri (Promega)	0.5 µg/ µl	
dNTP karışımı (Promega)	10 mM	

IV.a. RNA İzolasyonu

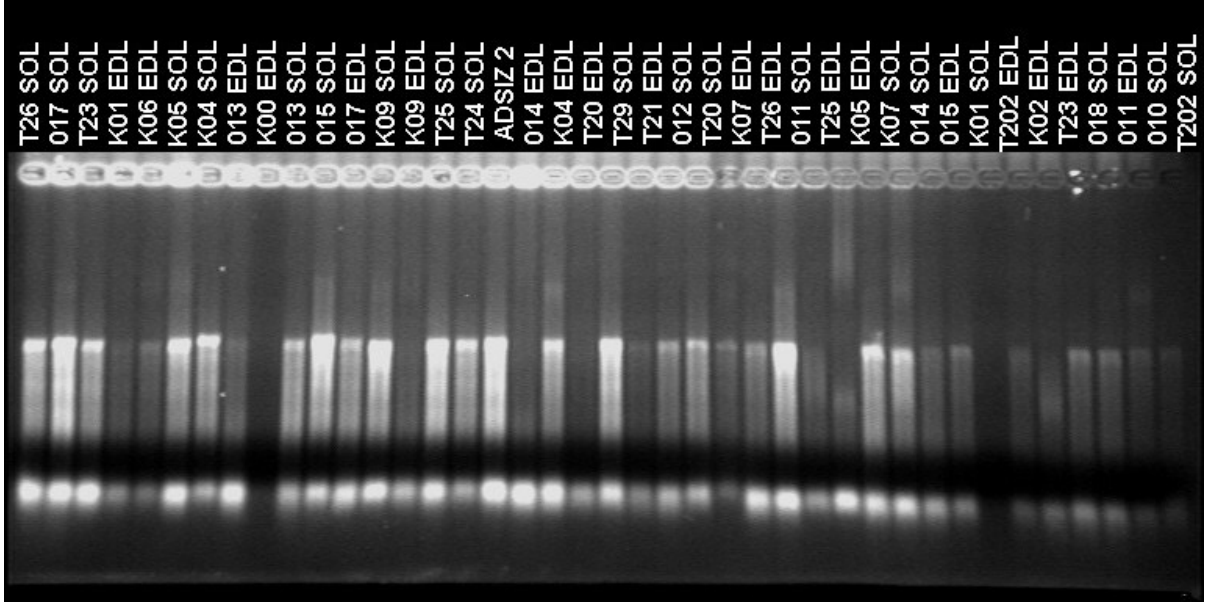
Dokulardan TRizol içerisinde dondurularak -80°C'de saklanan hücreler oda sıcaklığına getirildikten sonra standart TRizol izolasyon protokolü uygulanarak RNA izole edildi.

Bu süreçte izlenen basamaklar ekte verilmektedir.

1. Homojenize haldeki doku lizatı 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2. 200 µl kloroform eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 12.000 rpm de 15 dk 4°C' de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alındı.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. 12,000 rpm de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Pellet üzerine 1 ml DEPC içeren %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
8. RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C'de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA pelleti kurutuldu.
10. Pellet miktarına bağlı olarak 15 µl RNaz içermeyen su eklendi ve çözülmesi sağlandı.
11. 60°C' de 10 dk bekletildi ve analize kadar -20°C' de, analiz sonrası -80°C'de saklandı.

IV.a.1. RNA konsantrasyonu ve kalite kontrolü

RNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak 230, 260 nm ve 280 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı. %1 Formaldehid içeren denatüre agaroz jel elektroforezi ile izole edilen RNA kalite kontrolü yapıldı (Şekil 12).



Şekil 12. Spektrofotometrik yöntemle ölçülen RNA'nın kalite kontrolü verisi.

Tablo 3. RNA ölçümleri ve saflığına ilişkin absorbands analizi sonuçları.

Sample ID	Group	SAMPLE	Muscle	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	1.5ugr
9- K00 EDL	K	K00	EDL	380,48	9.512	4.873	1,95	0,78	3,9
4- K01 EDL	K	K01	EDL	98,49	2.462	1.449	1,70	0,49	15,2
42-K02-EDL	K	K02	EDL	87,24	2.181	1.212	1,80	0,78	17,2
21-K04-EDL	K	K04	EDL	175,96	4.399	2.389	1,84	0,82	8,5
33-K05-EDL	K	K05	EDL	113,77	2.844	1.463	1,94	1,04	13,2
5- K06 EDL	K	K06	EDL	83,93	2.098	1.261	1,66	0,54	17,9
28-K07-EDL	K	K07	EDL	90,52	2.263	1.318	1,72	0,72	16,6
14- K09 EDL	K	K09	EDL	169,38	4.235	2.411	1,76	0,42	8,9
43-K23-EDL	K	K23	EDL	81,42	2.036	1.087	1,87	1,02	18,4
45-011-EDL	O	O11	EDL	154,36	3.859	2.112	1,83	0,70	9,7
8- 013 EDL	O	O13	EDL	127,2	3.180	1.691	1,88	0,65	11,8
19-014-EDL	O	O14	EDL	111,7	2.793	1.507	1,85	0,23	13,4
37-015-EDL	O	O15	EDL	124,68	3.117	1.724	1,81	0,64	12,0
12- 017 EDL	O	O17	EDL	214,71	5.368	2.911	1,84	0,80	7,0
22-T20-EDL	T	T20	EDL	66,87	1.672	0,937	1,78	0,69	22,4
41-T202-EDL	T	T202	EDL	446,27	11.157	5.416	2,06	1,08	3,4
25-T21-EDL	T	T21	EDL	106,07	2.652	1.612	1,64	0,51	14,1
29-T24-EDL	T	T24	EDL	65,04	1.626	0,908	1,79	0,36	23,1
32-T25-EDL	T	T25	EDL	72,23	1.806	0,914	1,98	0,50	20,8
30-T26-EDL	T	T26	EDL	128,8	3.220	1.732	1,86	0,67	11,6
20-T27-EDL	T	T27	EDL	54,45	1.361	0,873	1,56	0,49	27,5
39-T29-EDL	T	T29	EDL	51,05	1.276	0,745	1,71	0,44	29,4
38-K01-SOLEUS	K	K01	SOL	117,28	2.932	1.637	1,79	1,02	12,8
7- K04 SOL	K	K04	SOL	393,79	9.845	5.100	1,93	1,18	3,8
6- K05 SOL	K	K05	SOL	270,4	6.760	3.600	1,88	1,21	5,5
34-K07-SOLEUS	K	K07	SOL	146,79	3.670	1.924	1,91	0,91	10,2
13- K09 SOLEUS	K	K09	SOL	234,12	5.853	3.023	1,94	0,75	6,4
40-06-SOLEUS	O	O06	SOL	66,33	1.658	1.023	1,62	0,42	22,6
46-010-SOLEUS	O	O10	SOL	138,89	3.472	1.975	1,76	0,56	10,8
31-011-SOLEUS	O	O11	SOL	261,16	6.529	3.493	1,87	0,93	5,7
26-012-SOLEUS	O	O12	SOL	75,65	1.891	0,990	1,91	0,89	19,8
36-014-SOLEUS	O	O14	SOL	132,03	3.301	1.805	1,83	0,92	11,4
11- 015 SOL	O	O15	SOL	370,29	9.257	4.780	1,94	1,51	4,1
2- 017 SOL	O	O17	SOL	264,32	6.608	3.420	1,93	1,71	5,7
44-018-SOLEUS	O	O18	SOL	168,23	4.206	2.256	1,86	0,45	8,9
27-T20-SOLEUS	T	T20	SOL	244,45	6.111	3.395	1,80	0,51	6,1
47-T202-SOLEUS	T	T202	SOL	154,95	3.874	2.151	1,80	0,73	9,7
17- T21 SOLEUS	T	T21	SOL	38,02	0.951	0,506	1,88	1,05	39,5
3- T23 SOL	T	T23	SOL	178,95	4.474	2.390	1,87	1,13	8,4
3- T23 SOL	T	T23	SOL	185,65	4.641	2.428	1,91	1,09	8,1
16- T24 SOLEUS	T	T24	SOL	191,29	4.782	2.636	1,81	0,69	7,8
15- T25 SOLEUS	T	T25	SOL	173,91	4.348	2.313	1,88	0,89	8,6
1-T26 SOL	T	T26	SOL	159,47	3.987	2.165	1,84	0,78	9,4
35-T27-SOLEUS	T	T27	SOL	61,77	1.544	0,825	1,87	0,58	24,3
23-T29-SOLEUS	T	T29-	SOL	208,3	5.207	2.801	1,86	0,75	7,2

Total RNA ölçümleri ve saflığına ilişkin 260 ve 280 nm absorbans analizleri Tablo 3'de verilmiştir.

IV.b. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, ImProm-II™ reverse transkriptaz enzimi (Promega) ve oligo(dT)15 primeri kullanıldı. Kalıp olarak 1µg RNA kullanıldı ve 0.5 µg oligo(dT)15 primeri ve RNaz içermeyen su ile 5 µl'ye tamamlanarak 70°C'de 5 dk denatüre edildi. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 10 dk bekletildi. Aynı bir tüpte 15 µl reverse transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Reverse transkripsiyon karışımı:

Son konsantrasyon	Hacim	
RNaz içermeyen su		6.6 µl
Improm-II™ tampon (5X) (Promega)	1X	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 mM	2.4 µl
dNTP karışımı (10mM)	0.5 mM	1 µl
Improm-II™ Reverse Transkriptaz		1 µl
Toplam:		15 µl

Toplam 20 µl olacak şekilde 5 µl RNA+primer karışımı, 15 µl reverse transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda Applied Biosystems-9700 PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi:

25°C' de	5 dk
42°C' de	60 dk
70°C' de	15 dk

Yukarıdaki tepkime sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 80 µl'ye sulandırıldı (20 µl cDNA +60 µl distile su=80 µl). İfade düzeylerinin analizinde incelenen her zaman noktasında yer alan hayvanlara ait dokular bir arada analiz edildi ve analizler her örnek için üçer kez tekrarlandı.

IV.c. Gerçek Zamanlı (*Real time*) RT-PCR

RT-PCR Koşulları:

2X SYBR Green karışımı	5 µl
25mM MgCl ₂	1.2 µl
Forward primer (10pmol/ µl)	0.4 µl
Reverse primer (10pmol/ µl)	0.4 µl
cDNA	2 µl
Distile su	1 µl
Toplam:	10 µl

10 µl RT-PCR tepkimesi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

94°C'de	2 dk	
94°C'de	2 s]
55-60°C'de	20 s] x35 döngü

IV.d. Primer dizilerinin hazırlanması

SYBR Green tekniği, özgül gen ifadesi nicel analizinde sıklıkla kullanılan bir tekniktir. PCR tüpünde polimerize olan çift zincirli PCR ürününe katılan ve interkale edici bir floresan boya olan SYBR Green boyasının ürün miktarı ile orantılı floresans vermesi prensibine dayanmaktadır. Hazırlanan cDNA havuzundan özgül gen fragmanlarının amplifikasyonu için seçilecek ekonomik ancak dikkat gerektiren yönleri de bulunan bir uygulamadır. SYBR Green tekniği ile gen ifadesinin nicel analizi için uygun primer seçimi en önemli noktadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Benzer şekilde RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu SYBR Green tekniğinin başarısını tehdit eden bir diğer durumdur. cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı eksonlardan seçilmesi, ampikon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz) primerlerin bağlandığı eksonların uzak seçilerek bu eksonlar arasında yer alan intronun cDNA dizisinin çoğaltılması sırasında kontamine olan DNA üzerinden çoğaltılmaması, eğer mümkünse PCR reaksiyonu koşullarının olası bir DNA kontaminasyonunda DNA dizisini çoğaltmaması için optimize edilmesi gereklidir (uzama süresinin kısıtlı tutulması).

IV.e. Global transkriptom profilenmesi (*Microarray Analysis*)

Çalışmanın başlangıç aşamasında uygulanması planlanmamış olsa da çalışma örneklerinden seçilenler global gen ifade analizi çalışmasına dahil edilmiştir. mRNA gen ekspresyonu ifadesinin bilinen en hassas analiz yöntemi olan gen çipi deneyleri, bir doku veya hücre tipinin tüm genomunun herhangi bir fizyolojik veya patolojik duruma ne şekilde cevap verdiğini ortaya koyabilen bir çalışmadır. Proje önerisinde yapılması planlanan gen ifade analizlerinin bu çalışma ile daha da genişletilmesi mümkün olmuş, incelenmesi öngörülen ve planlanan genlerin dışında kas dokusunda ifade olan 31.500 genin ifade analizinin çalışılması mümkün olmuştur.

RNA kalite kontrolünü geçen ve aşağıdaki tabloda listelenen örnekler global transkriptom analizine alındı. En az 10 µg total RNA kullanılarak, reverse transkriptaz enzimi aracılığı ile T7 promotörü oligodT primerlerle tek iplikli cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezini takiben random primerler kullanılarak çift iplikli cDNA sentezi tamamlandı.

Konsantrasyon ölçümü ve kalite kontrolü sonrasında cDNA kullanılarak in vitro transkripsiyon aracılığı ile cRNA sentezi uygulandı ve işaretli cRNA eldesi tamamlandı. cRNA örneklerinin kalite kontrolü sonrasında fragmentasyon işlemi uygulanarak işaretli cRNA 6 saat boyunca Affymetrix RAE_230 v2.0 çiplerine hibridize edildi. Hibridizasyon sonrası gerekli yıkama ve sinyal geliştirme işlemleri tamamlanarak çipler Affymetrix 3000 scanner aracılığı ile görüntülendi.

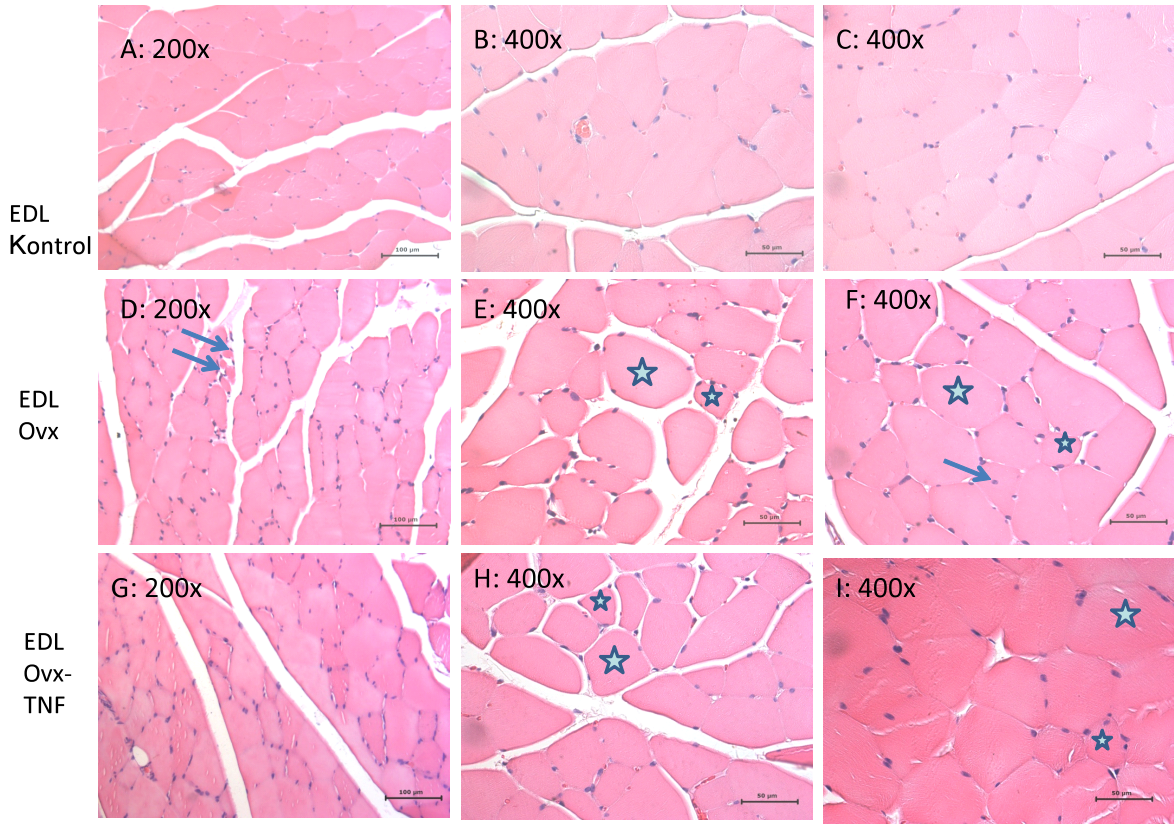
Görüntü dosyaları (dat) Affymetrix Microarray Expression Suite uygulaması ile CEL dosyalarına dönüştürüldü ve "R" istatistik paketi yardımı ile (2.10.0) analiz edildi. İstatistiksel analiz yaklaşımı ve adımları aşağıda sıralanmıştır.

1. Her probeset için alınan gen ifade değerlerine log₂ transformasyonu uygulandı.
2. Tüm çip probeset gen ifade değerleri ayrı ayrı çip ortalamasına normalize edildi.
3. Her deney grubunda genel gen ifade oranı bazal gen ifade değerinin altında olan probesetler "absent" kabul edilerek analiz dışında bırakıldı.
4. Gruplar arasında p anlamlılık değeri 0.01 olarak alınarak non-parametrik ANOVA istatistiksel analizi uygulandı ve (+) bulunan örnekler parametrik analiz için değerlendirildi.
5. Parametrik analiz sonucunda p<0,01 değerini sağlayan probesetler arasında anlamlı değişim bulunduğu kabul edildi.

BULGULAR

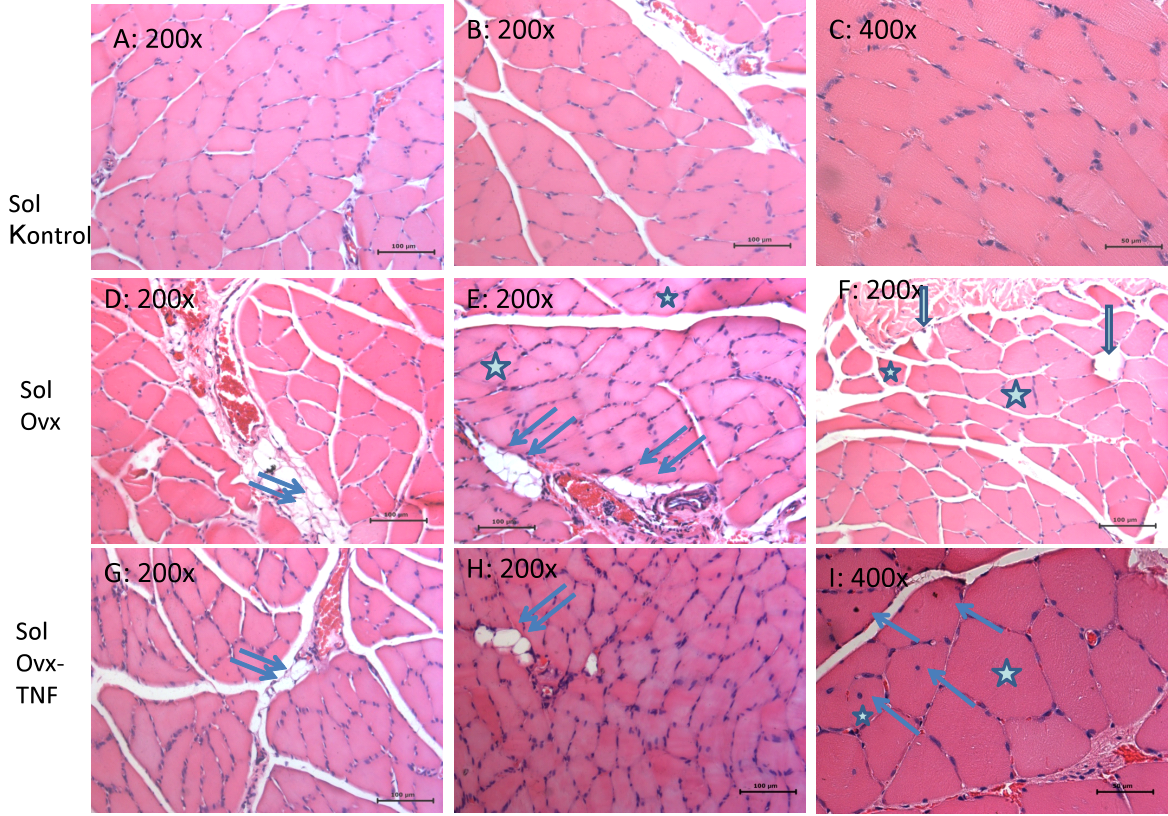
I-ışık mikroskopi:

HE boyaması yapılmış kesitlerde OVX geçirmiş deneklerin kaslarında ayrılma gözlemlendi (Şekil 13 E, H). Yine OVX gruplarının kas hücreleri büyüklüklerine bakıldığında yan yana gözlenen hipertrofik ve atrofik hücreler izlendi (Şekil 13 E, F, H, İ). Ayrıca OVX grubunun EDL kasına ait örneklerde kas hücrelerinin bazılarında merkezi çekirdek saptandı.

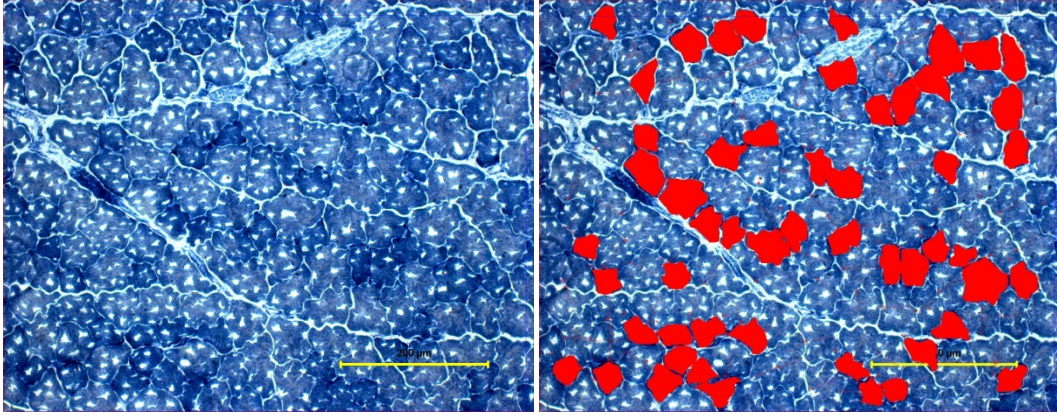


Şekil 13: HE ile boyalı EDL kası kesitleri: Çifte ok atrofik lif kümelerini, tek ok merkezi çekirdeği, küçük yıldızlar atrofik ve büyük yıldızlar hipertrofik hücreleri göstermektedir.

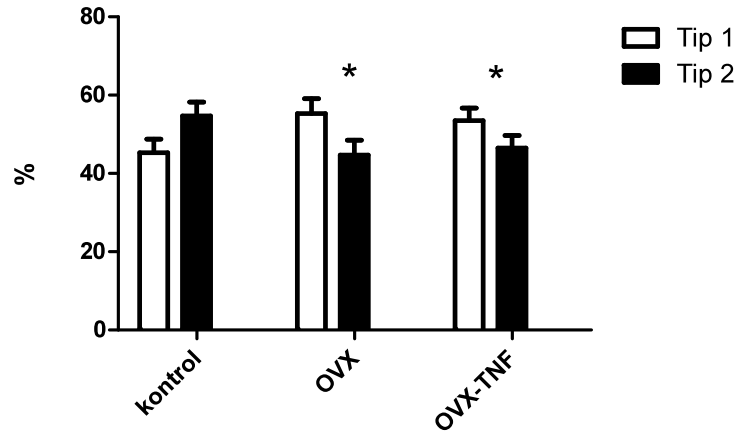
Soleus kasına ait örneklerde OVX ve OVX-TNF grubunda kas hücrelerinin birbirlerinden ayrıldığı, yanyana atrofik ve hipertrofik hücrelerin bulunduğu görüldü (Şekil 14). OVX-TNF grubunda myopatiyi işaret eden merkezi çekirdek içeren kas hücreleri gözlemlendi. OVX ve OVX-TNF gruplarında aralarda yağ hücreleri görüldü.



Şekil 14: Kontrol, OVX, OVX-TNF uygulanmış soleus kası kesitleri: Çifte ok infiltr olmuş yağ hücrelerini, tek ok merkezi çekirdeği, kalın ok dejenere kas hücrelerini, küçük yıldızlar atrofik ve büyük yıldızlar hipertrofik hücreleri göstermektedir.

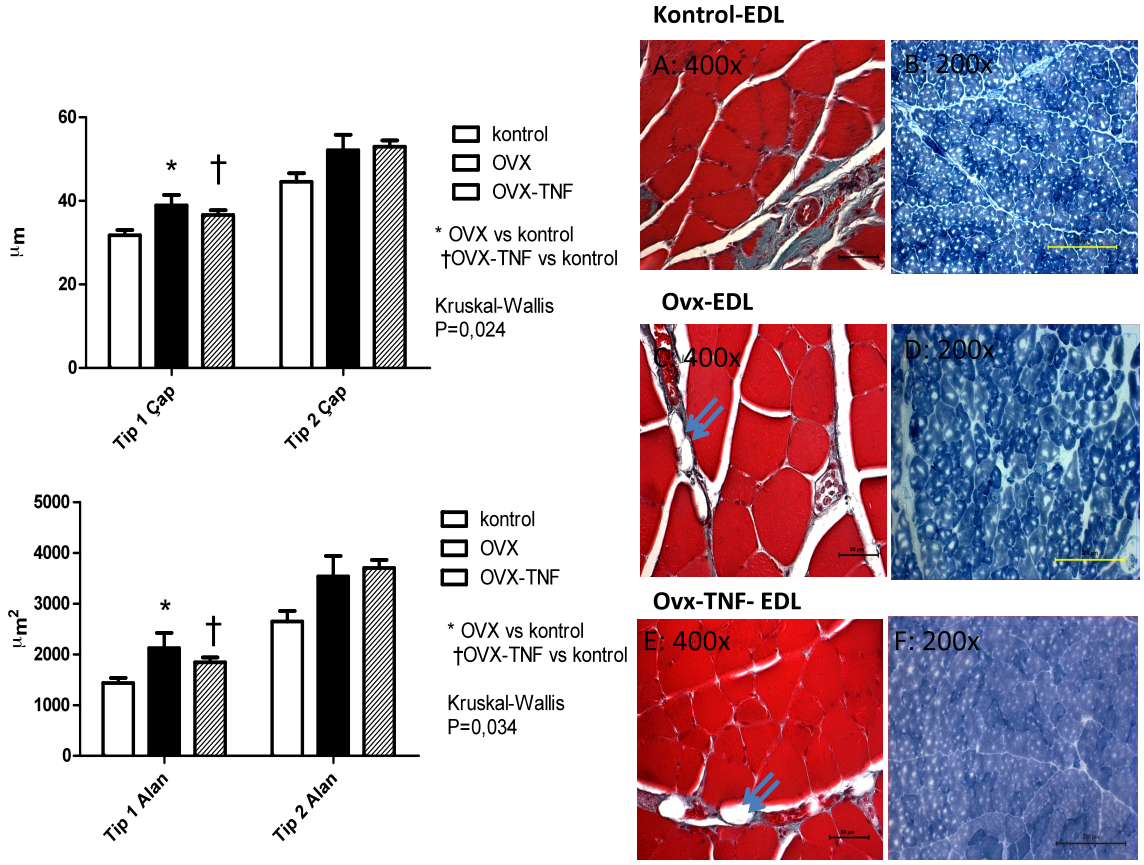


Şekil 15: Şekilde NADH-TR boyanmış kesitler ve ölçüm sistemi gösterilmektedir. İncelenen alanda koyu boyanan Tip 1 ve açık boyanan Tip 2 kas lifleri (Kırmızı ile işaretliler) ayırt edilmiştir. En küçük çapları (ince kırmızı çizgiler) ve kas lifi alanları ölçülmüştür.



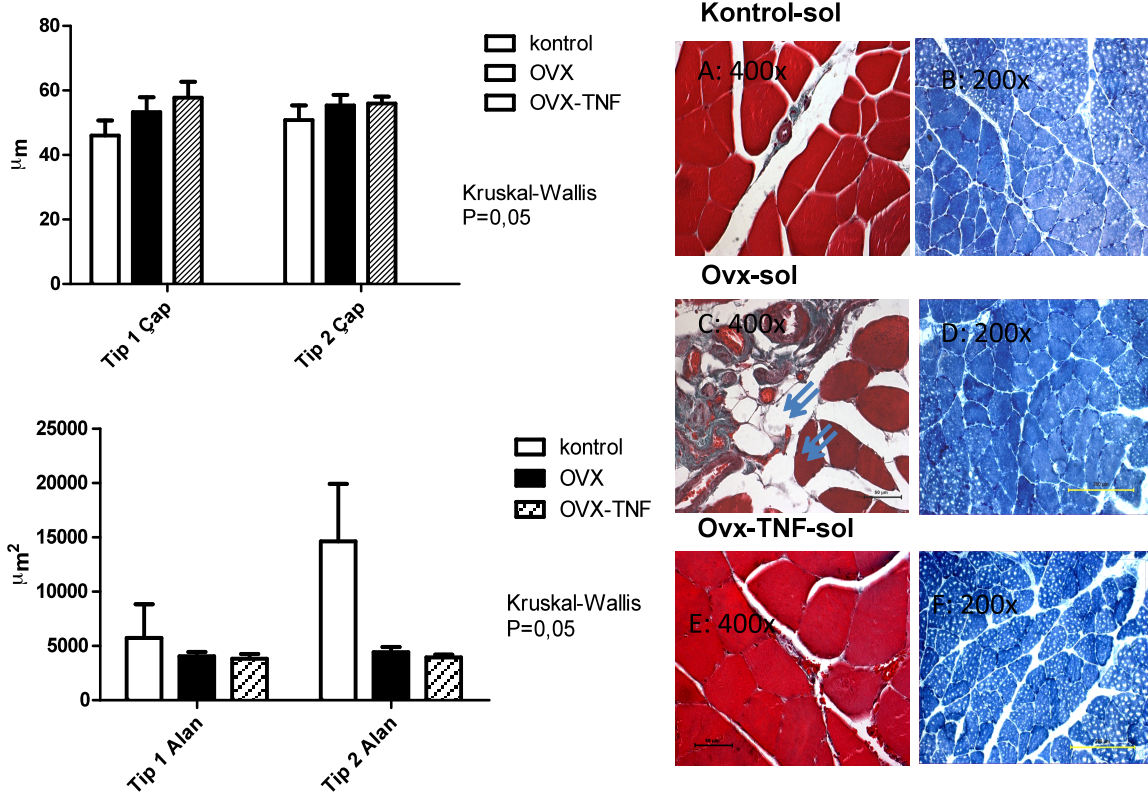
Şekil 16: EDL kaslarının her grup için kas lifi yüzdeleri (Student T testi p=0.043).

EDL kasında tip 1 ve tip 2 liflerin toplam lif sayısına oranı hesaplandığında OVX ve OVX-TNF grubunda yüzde olarak tip 1 kas lifleri ağırlıktayken kontrol grubunda tip 2 kas lifinin ağırlıkta olduğu gözlemlendi (Şekil 16). Soleus kasında tip 2 lifleri sayıca çok az olduğu için istatistik yapılmadı.



Şekil 17: EDL kaslarının Trikróm, NADH-TR boyamaları, tip 1 ve tip 2 liflerinin çap ve alan grafikleri. Oklar yağ hücrelerini göstermektedir.

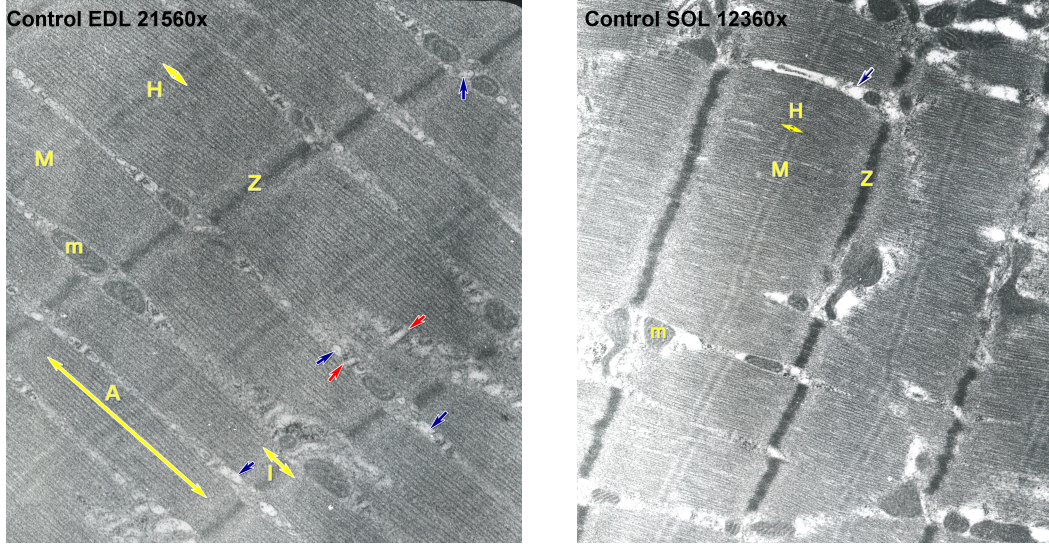
Trikróm boyasıyla EDL kasına ait örneklerde yeşil boyanmış yağ dokuları izlendi. OVX ve OVX-TNF gruplarında kas liflerinin aralarında yağ hücrelerinin varlığı saptandı. NADH-TR boyamasıyla özellikle yavaş kasılan tip 1 liflerinin çaplarında ve alanlarında OVX ve OVX-TNF gruplarında anlamlı bir artış olduğunu ancak yine bir miktar yüksek görünmekle birlikte tip 2 liflerinin çap ve alanlarında anlamlı bir artış olmadığı belirlendi (Şekil 17).



Şekil 18: SOL kaslarının Trikróm, NADH-TR boyamaları, tip 1 ve tip 2 liflerinin çap ve alan grafikleri: Oklar yağ hücrelerini göstermektedir.

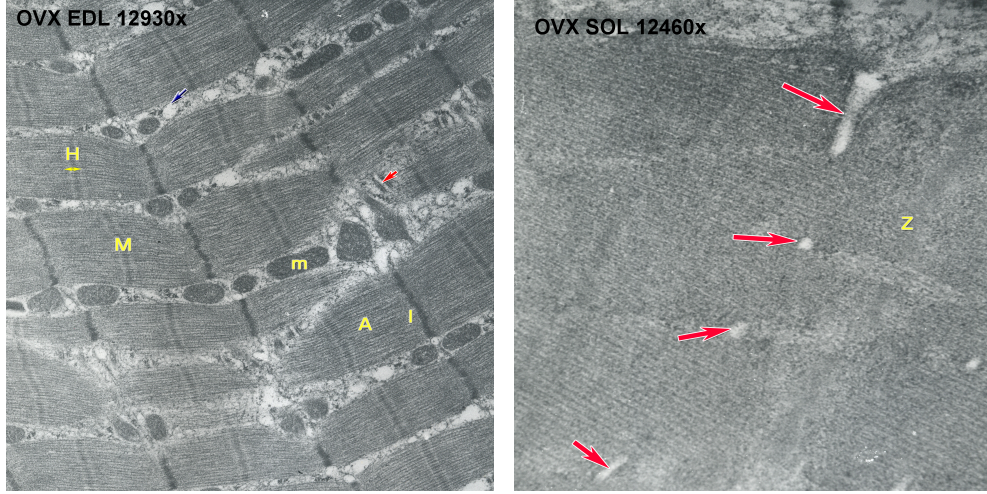
Soleus kasına ait örneklerin trikróm boyamalarında kas liflerini çevreleyen yeşil renkte perimisyum izlendi. Yapılan incelemelerde OVX ve OVX-TNF grubunda kas lifleri arasında yağ hücreleri saptandı. NADH-TR boyamasıyla ayırt ettiğimiz tip 1 ve tip 2 liflerinin çap ve alan ölçümlerinde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 18).

II-Elektron Mikrosopi:



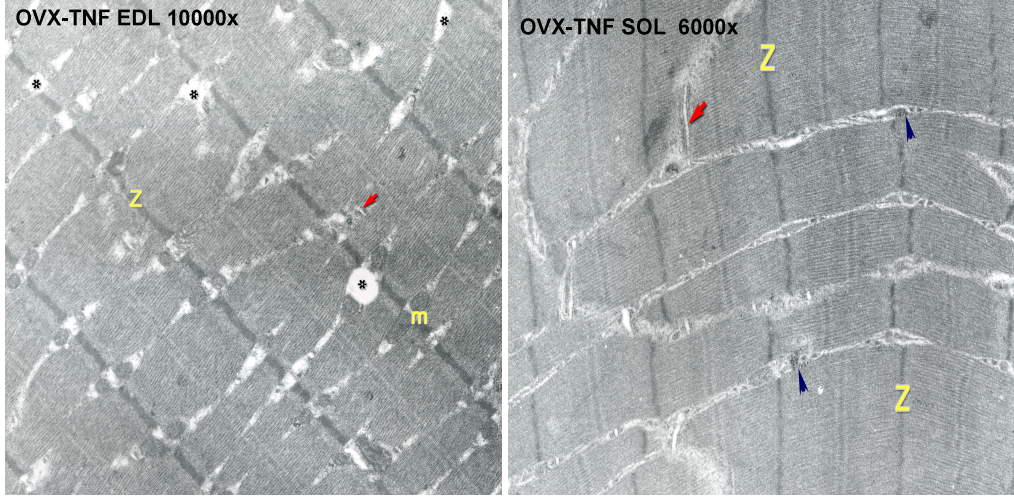
Şekil 19: Kontrol grubu elektron mikrografları: A=A bandı, I=I bandı , H=H bandı, M=M bandı, Z=Z çizgisi, m=mitokondri, mavi ok=sarkoplazmik retikulum, kırmızı ok=T-Tubulus.

Kontrol grubuna ait EDL kası kesitlerinde normal mitokondriyon sayısı ve iyi korunmuş bant yapıları gözlemlendi. Soleus kaslarındaysa çok fazla sayıda mitokondri ve yine yapısı korunmuş bantlara rastlandı (Şekil 19).



Şekil 20: OVX grubu elektron mikrografları. A=A bandı, I=I bandı , H=H bandı, M=M bandı, Z=Z çizgisi, m=mitokondri, kırmızı ok=T-Tubulus.

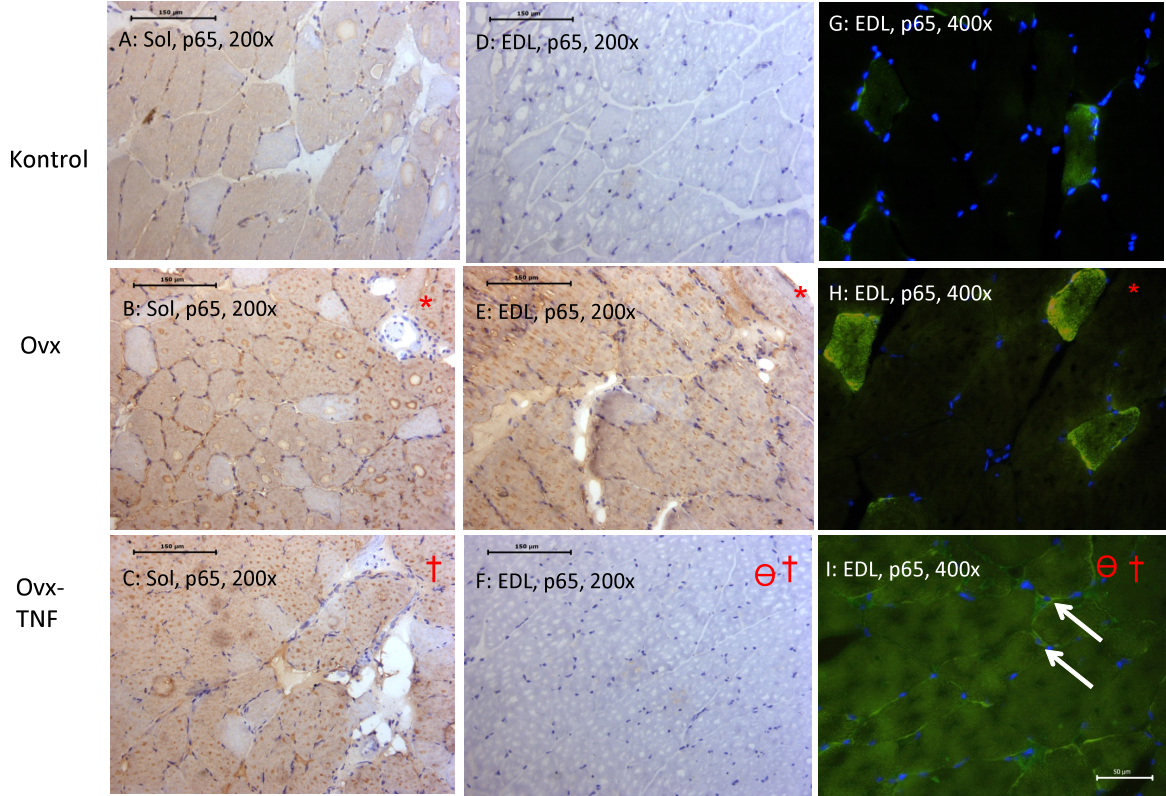
OVX grubuna ait EDL kaslarınının sarkomerleri hafifçe dağılmış görülmekle birlikte genel kas görünümü sağlıklı olarak gözlemlendi. Mitokondrilyonlar hafifçe şişmiş ve kontrol grubundan daha az sayıda bulundu. Aynı grubun soleus kaslarına ait örneklerinde kontrol grubuna oranla daha az mitokondri içerdiği gözlemlendi. Genel olarak kas lifleri sağlıklı görünmekle birlikte liflerde papyon şeklinde şişme olduğu izlendi (Şekil 20).



Şekil 21: OVX-TNF grubu elektron mikrografları: Z=Z çizgisi, m=mitokondri, mavi ok=sarkoplazmik retikulum, kırmızı ok=T-Tubulus, asteriks=ayrışma.

OVX-TNF grubunun EDL kasları sağlıklı bir görüntü veren normal miktarda ve dağılımda mitokondri içerdiği, fakat yer yer liflerin arasında boşluklar gözlendi. Aynı grubun SOL kaslarının yüksek miktarda mitokondri ve glikojen içerdiği gözlendi. Krista ve t-tubulus yapılarının korunduğu saptandı (Şekil 21).

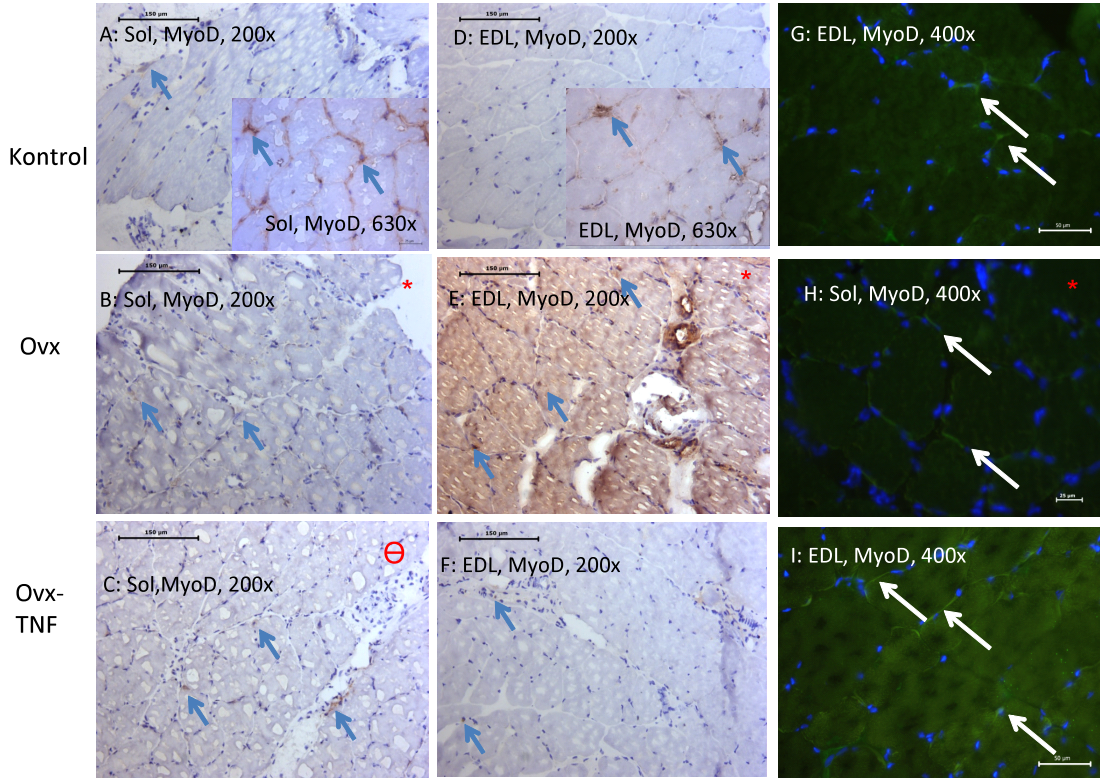
III- İmmünohistokimya:



(Kruskal Wallis-Connover: * ovx vs kontrol † ovx vs ovx-TNF ⊖† ovx-TNF vs kontrol P<0,001)

Şekil 22: EDL ve SOL kaslarına ait örneklerde p65 molekülünün immün işaretlenmesi.

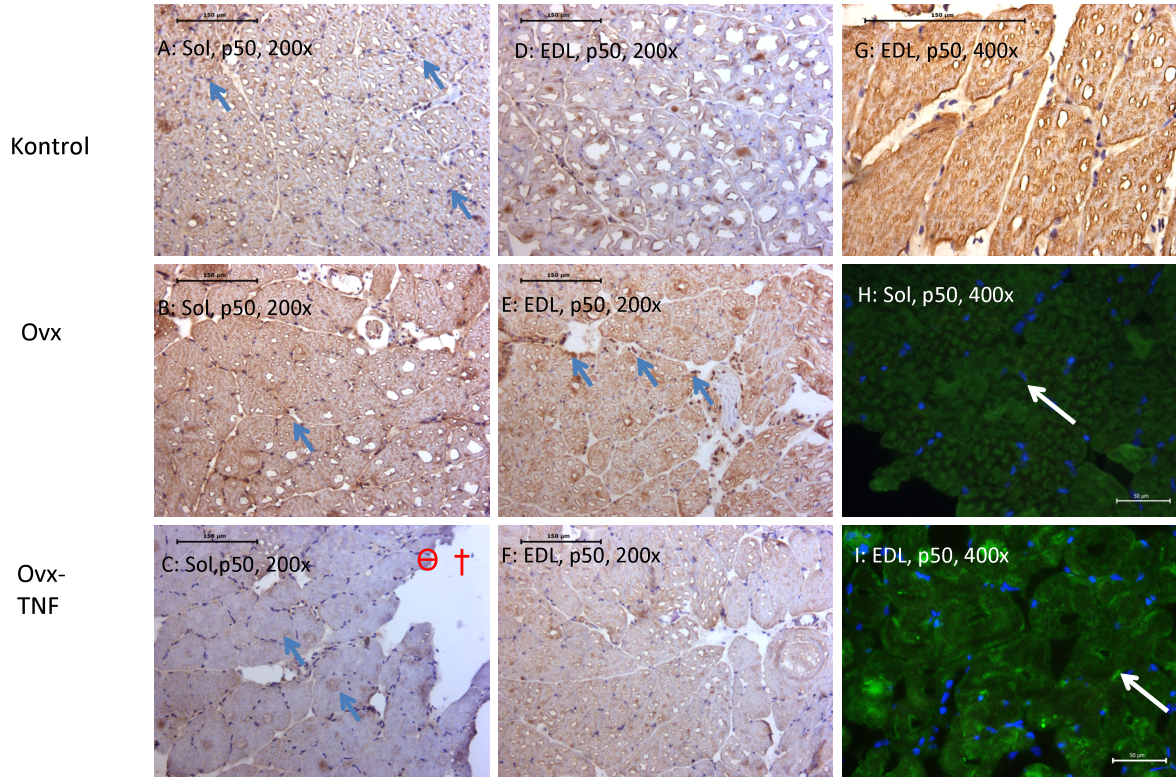
Kaşeksi yolağında aktif olup kullanılmama yolağında aktif olmayan p65 antikoruyla immün işaretlenmiş EDL ve soleusa ait kesitler de p65 immünreaktivitesi hem sitoplazmada hem çekirdekte gözlemlendi. Hem EDL hem soleus kasında gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). Her iki kasa ait örneklerde de OVX grubunda p65 immünreaktivitesi kontrol ve tedaviye göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$). OVX-TNF grubunda soleus kasında p65 molekülü OVX grubuna göre anlamlı olarak daha az boyanma gösterirken, EDL kasında her iki gruptan da farklı, iki grubun arasında bir değer gösterdi. P65 molekülünün OVX ve OVX-TNF gruplarında kontrol grubuna göre işaretlenmesinin sitoplazmadan çekirdeğe doğru kaydığı gözlemlendi (Şekil 22).



(Kruskal Wallis-Conover: * ovx vs kontrol \ominus ovx-TNF vs kontrol Sol P=0,001, EDL P=0,046)

Şekil 23: Myo D molekülünün immün işaretlenmesi.

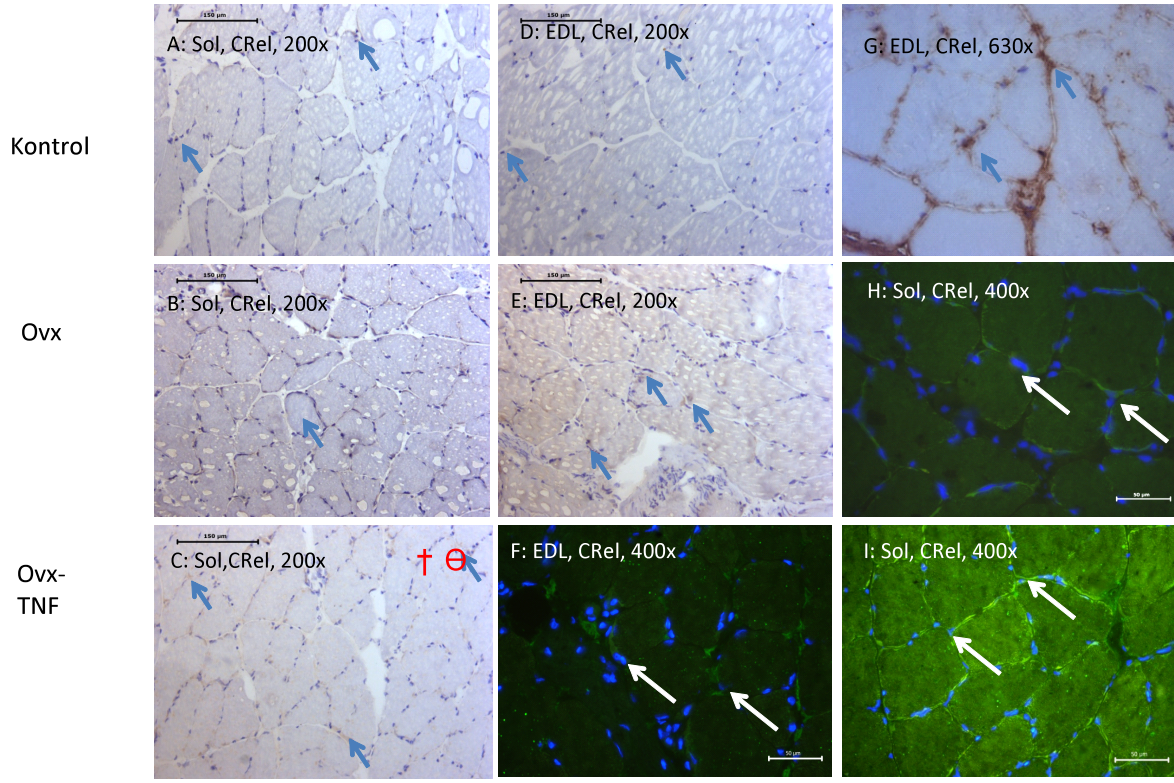
Kas rejenerasyonu ve farklılaşmasında görev alan MyoD molekülü ile çekirdekte boyanma saptandı. Soleus kasında kontrolde az, OVX ve OVX-TNF gruplarında anlamlı olarak daha fazla MyoD immunoreaktivitesi gözlemlendi ($p=0,001$). Hızlı kasılan EDL kasındaysa OVX grubunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek immunoreaktivite gösterdiği saptandı ($p=0,046$) (Şekil 23).



(Kruskal Wallis-Conover: † ovx vs ovx-TNF ⊖ ovx-TNF vs kontrol Sol P=0,033)

Şekil 24: p50 molekülünün immün işaretlenmesi.

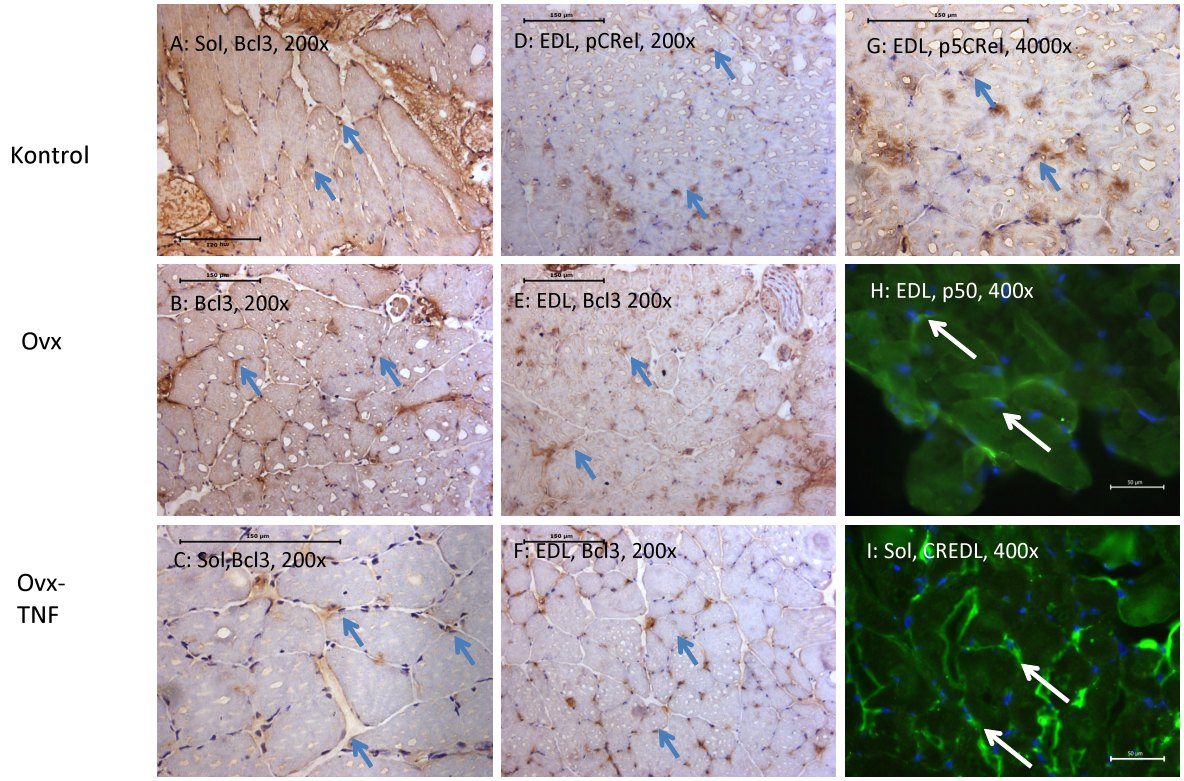
Her iki atrofi yolağında da yer alan p50 ile örneklerimizde yoğunlukla sitoplazmik işaretlenme gözlemlendi. Soleus kasında OVX-TNF grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha az boyanma izlendi. EDL kasında ise bir fark gözlemlendi (Şekil 24).



Kruskal Wallis-Conover: † ovx vs ovx-TNF ⊖ ovx-TNF vs kontrol Sol P=0,001)

Şekil 25: C-Rel molekülünün immün işaretlenmesi.

EDL ve SOL kaslarının her 3 gruba ait örneklerinde C-Rel ile immün işaretlemenin çekirdekte olduğu izlendi. Soleus kasında OVX-TNF grubunda kontrol ve OVX grubuna göre anlamlı olarak artmış işaretlenme saptandı ($p=0,001$). EDL kasında ise gruplar arası anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 25).



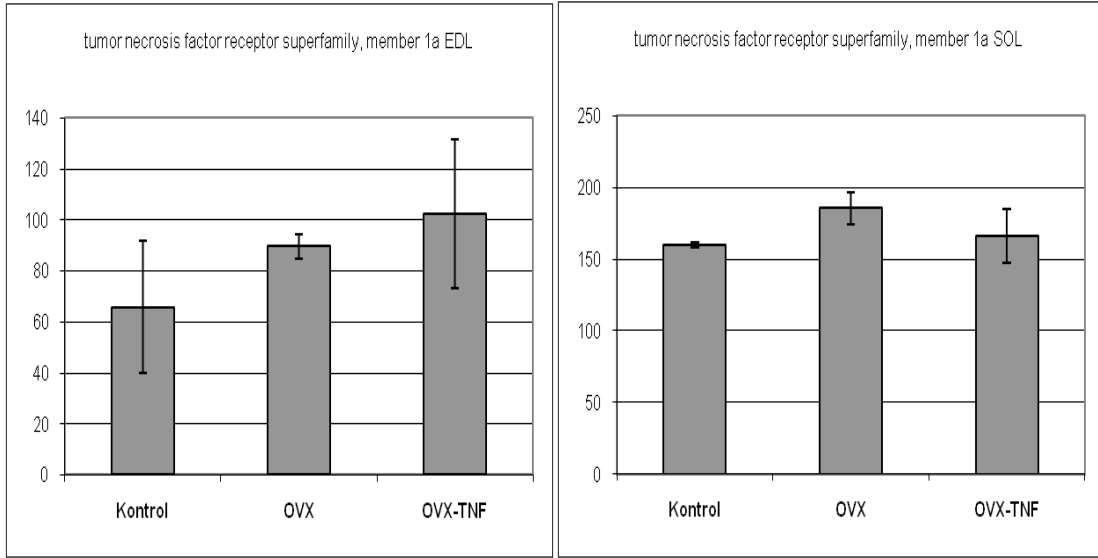
Şekil 26: Bcl3 molekülünün immün işaretlenmesi.

Nükleer işaretlenme gösteren ve kullanılmama atrofisinde görev alan Bcl3'de her iki kasta da gruplar arası fark saptanmadı (Şekil 26).

IV- Gen ifade analizi:

Araştırılması önceden planlanan atrofi yollarında farklılık gösteren 6 molekülün ekspresyonları aşağıda gösterilmektedir.

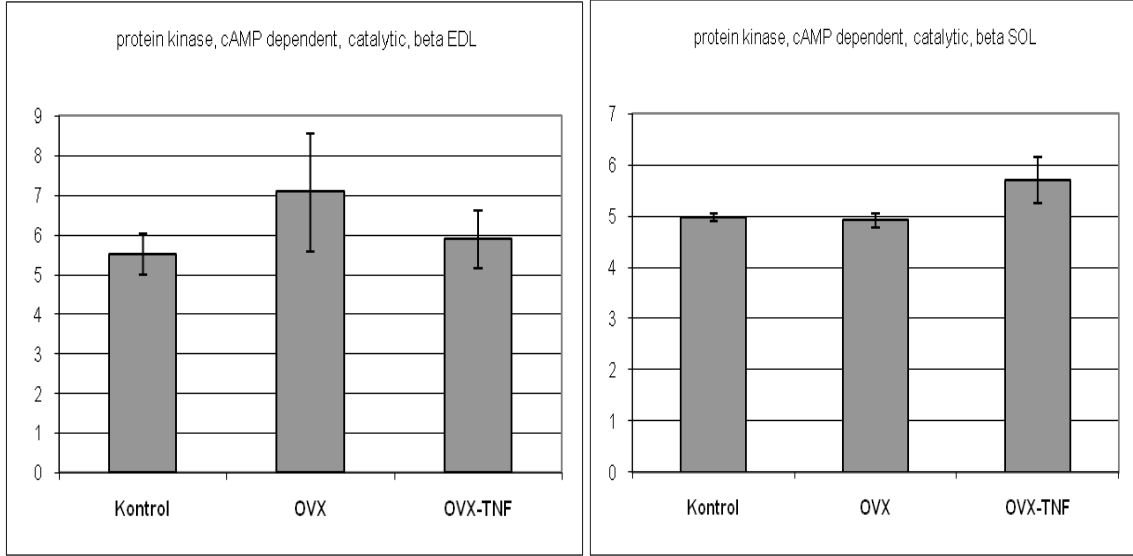
TNF-alfa reseptörü 1a:



Şekil 27: TNF-alfa reseptörü 1a'nın hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri (ortalama ± SE)

Ovariyektomi TNF-alfa reseptörü ekspresyonunda kontrol grubuna oranla bir artmaya sebep olmuştur. OVX-TNF grubunda ise antagonist uygulanması diğer gruplardan anlamlı bir farklılığa yol açmamıştır. Reseptör ekspresyonu EDL kaslarında sınırdadır, SOL kaslarındaysa sadece düşük seviyededir (Şekil 27).

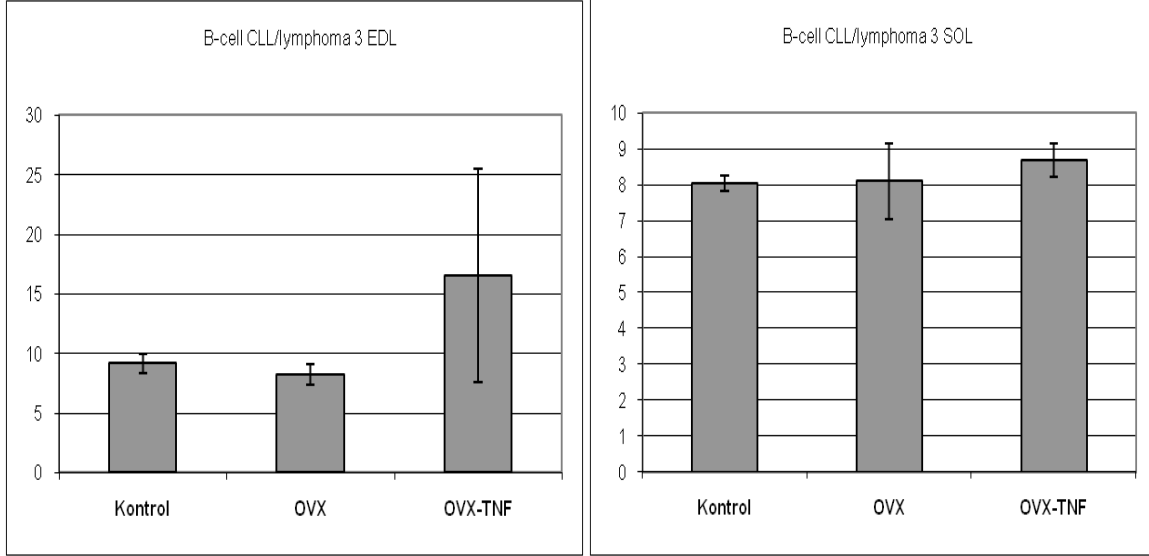
C-Rel:



Şekil 28: C-Rel in hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri (ortalama \pm SE).

C-Rel'in kullanılmama atrofisinde literatürde (Hunter ve ark. 2004) artışı gösterilmiştir. Ancak C-Rel kaşekside sabit ekspresyon gösterir. Kontrol ve OVX grupları arasında C-Rel molekülünde bir artış her iki kasta da gözlemlenmemiştir. Ekspresyon düzeyleri her grupta yok kabul edilecek kadar azdır (Şekil 28).

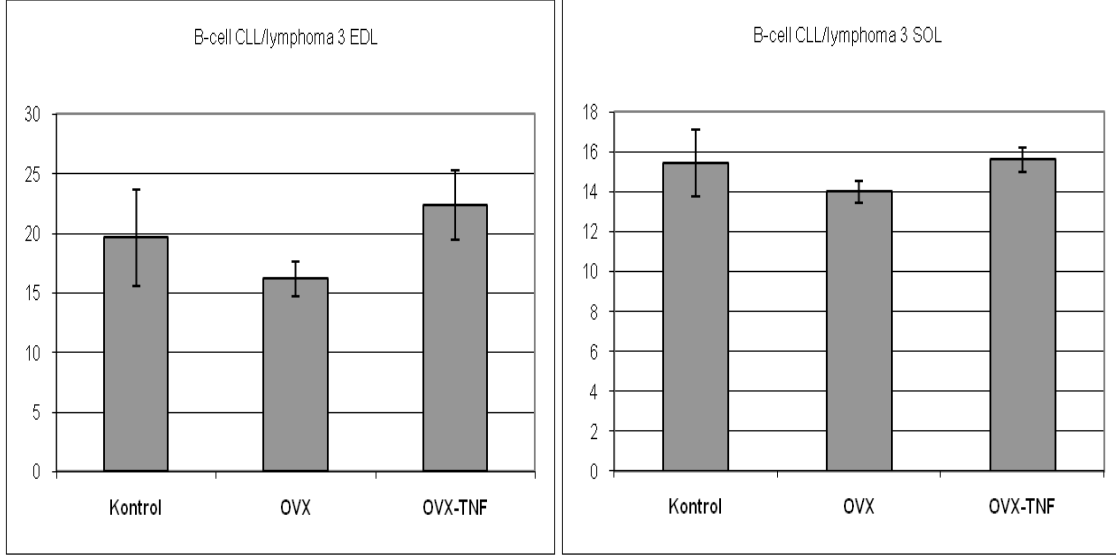
Bcl3:



Şekil 29: Bcl3 ün hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri (ortalama \pm SE).

Bcl3 de kullanılmama atrofisinde literatürde (Hunter ve ark. 2004) artış gösterilmiştir. Ancak Bcl3 kaşekside sabit ekspresyon gösteren bir moleküldür. Kontrol ve OVX grupları arasında C-Rel molekülünde bir artış her iki kasta da gözlemlenmemiştir. Ekspresyon düzeyleri her grupta yok kabul edilecek kadar azdır (Şekil 29).

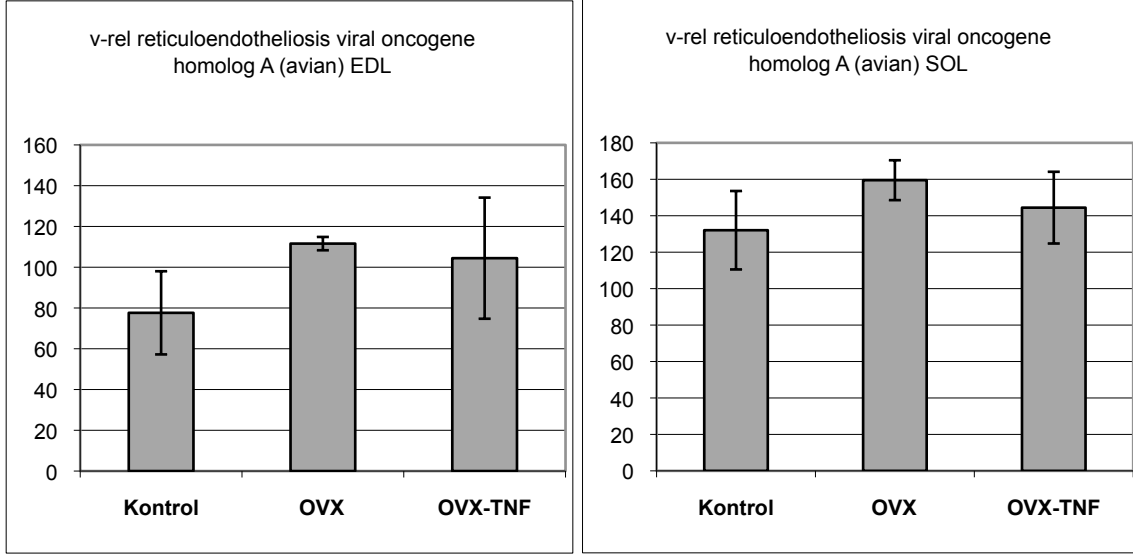
P50:



Şekil 30: p50 nin hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri (ortalama \pm SE).

P50 molekülü her iki atrofi yolağında da işlev gören bir transkripsiyon regülatör molekülüdür. Ancak OVX grubunda kontrol grubuna oranla bir artış görülmemiştir. Ekspresyon düzeyleri birbirine yakındır ve yok kabul edilecek seviyededir (Şekil 30).

P65:



Şekil 31: p65 in hızlı kasılan EDL (sol) ve yavaş kasılan SOL (sağ) kaslarındaki ekspresyon değerleri (ortalama ± SE).

P65 molekülü kullanılmama atrofisinde artış göstermezken kaşeksi yolağında ekspresyonunda artış gözlemlenen bir moleküldür. P65 seviyelerindeki artış kaşeksi yolağına dair bir ipucu verebilir (Hunter ve ark. 2004). OVX grubunun kaslarında p65 molekülü kontrol grubuna oranla daha yüksek olarak gözlemlenmektedir. Ekspresyon seviyeleri kontrol grubunda marjinal olacak kadar az seviyedeysen OVX grubunda düşük de olsa kontrol grubundan yüksek düzeyde bir ekspresyon göstermektedir. OVX-TNF grubunda yine diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 31).

TNF-alfa reseptörü 1a, C-Rel, Bcl3, P50 ve P65 molekülleri dışında çalışmanın başında incelenmesi hedeflenmeyen ancak global gen ifade analizi uygulaması sonucunda anlamlı değişiklik saptanan 88 molekül saptanmıştır. EDL kasında sadece insülinin moleküler sinyal yolağında rolü olan protein fosfataz 1 geninde anlamlı fark görülmüştür (Tablo 4).

Tablo 4: EDL kasında farklılık gösteren molekül.

	Kontrol	OVX	OVX-TNF	P-değeri	FDR
Protein fosfataz 1 düzenleyicisi	130,3818	92,36049	33,06839	0,000379	0,969486

Soleus kasında farklılık gösteren genler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5: Soleus kasında farklılık gösteren genler.

	Kontrol	OVX	OVX-TNF	P-değeri	FDR
Talin 1	26,13404	23,1334	54,48784	2,51E-05	0,354529
similar to homeobox-containing transcription factor	13,04024	26,93957	11,74316	0,000132	0,588215
chemokine (C-C motif) ligand 2	20,37303	26,41061	51,68061	0,000182	0,708669
R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)	235,0753	141,7232	138,4996	0,000226	0,727095
homeo box D9	60,60009	108,3822	58,85566	0,000296	0,744599
cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2	14,77468	19,95045	28,62136	0,000321	0,744599
methionine adenosyltransferase II,	586,4672	539,7626	910,668	0,000451	0,815485
myb-like, SWIRM and MPN domains 1	18,33254	19,19972	30,88304	0,000464	0,815485
Jun oncogene	192,1549	333,1331	217,2765	0,000632	0,845654
similar to lipid droplet	67,60481	107,5946	40,11457	0,000707	0,845654

associated protein					
CDW92 antigen	45,82802	52,93057	71,21254	0,000792	0,879769
chemokine (C-C motif) ligand 7	8,896607	9,268173	16,12565	0,000879	0,887337
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	195,9093	122,9426	344,6558	0,00097	0,887337

Bu moleküllerin etkilediği süreçler DNA hasarına yanıt olarak oluşan apoptotik sinyal, integrin sinyal yolağı, hücre hareketinde mCalpain, Rho hücre hareketi sinyal yolağı, hücre yayılmasında uCalpain ve eşlikçileri, yerel yapışma, Msp/Ron reseptör sinyal yolağı, makrofajda Pertusis toksine duyarız CCR5 sinyalizasyonu, sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, metiyonin metabolizması gelişimi, selenoamino asit metabolizması, immünoloji agrinin postsinaptik farklanma, anjiyotensin II tarafından Pyk2 bağımlı sinyal üzerinden yönlendirilen JNK yolağı aktivasyonu, BCR sinyal yolağı, D4-GDI sinyal yolağı, EGF sinyal yolağı, EPO sinyal yolağı, FAS sinyal yolağı (CD95), mast hücrelerinde Fc epsilon reseptör I sinyal yolağı, IGF-1 sinyal yolağı, IL 2 sinyal yolağı, IL 6 sinyal yolağı, Th1 oluşumunda IL12 ve Stat4 bağımlı sinyal yolağı, Gleevec tarafından yönlendirilen hücrel büyümenin inhibisyonu, insulin sinyal yolağı, keratinosit farklanması, MAPKinaz sinyal yolağı, makrofaj farklanmasında etkili METS, sinir büyüme etmeni (NGF) yolağı, Nrf2 üzerinden oksidatif stressi tetikleyen gen vurgusu, PDGF sinyal yolağı, makrofajda pertusis toksine duyarız CCR5 sinyali ve DREAM tarafından düzenlenen ağrı duyusunun baskılanmasının düzenlenmesi şeklinde bulunmuştur.

SOL ve EDL kaslarında farklı gen vurgusu gösteren genler Tablo 6’de verilmiştir.

Tablo 6: SOL ve EDL kaslarında farklı vurgu gösteren genler.

	Kontrol	OVX	OVX-TNF	P-değeri	FDR
Empty spiracles homeobox 2	23,356	39,330	39,46	0,0002	0,983
KH-type splicing regulatory protein	14,287	20,012	24,2142	0,0002	0,983
SPEG complex locus	11,524	13,485	19,022	0,0006	0,983

SOL ve EDL kaslarından elde edilen mRNA'lar bir havuzda toplanıp birlikte değerlendirildiğinde 3 genin istatistiksel olarak anlamlı farklı vurgusu saptanmıştır. Ancak her üç gen de kas işlevi ile doğrudan ilgili olmayan süreçlerin düzenleyicileri olarak karşımıza çıkmıştır (Tablo 7 ve 8).

Tablo 7: SOL ve EDL kaslarından elde edilen mRNA'lar dan uygulanan global gen ifade analizi çalışmasında çalışma gruplar arasında farklılık gösteren gen ifade farkları (P=0.01).

	Kontrol	OVX	OVX-TNF	P-değeri	FDR
<i>asparaginase like 1</i>	210,7023	159,5375	136,2911	0,008507	0,983257
<i>Bone morphogenetic protein 1</i>	27,09321	28,63151	39,84663	0,00924	0,983257
<i>coiled-coil domain containing 95</i>	21,01373	19,91443	15,16214	0,008206	0,983257
<i>chemokine (C-C motif) ligand 7</i>	8,365746	8,39244	15,88387	0,00646	0,983257
<i>CD248 molecule, endosialin</i>	14,92488	14,96461	11,69848	0,009805	0,983257
<i>cartilage intermediate layer protein 2</i>	23,82064	37,01182	41,85185	0,001319	0,983257
<i>chymase 1, mast cell</i>	47,25928	28,87602	59,47629	0,00743	0,983257
<i>cartilage associated protein</i>	14,23739	10,92832	9,82736	0,004771	0,983257
<i>dermokine</i>	31,32141	25,81272	20,78332	0,002022	0,983257
<i>empty spiracles homeobox 2</i>	23,35692	39,33081	39,4609	0,000213	0,983257
<i>GATA zinc finger domain containing 2B</i>	48,0691	51,62277	31,32953	0,004172	0,983257
<i>glycolipid transfer protein domain containing 1</i>	60,73501	58,95048	41,86517	0,004524	0,983257
<i>interferon (alpha, beta and omega) receptor 1</i>	6,582301	4,922467	5,544312	0,006989	0,983257
<i>Inner membrane protein, mitochondrial</i>	40,9862	30,83362	58,16915	0,00516	0,983257
<i>KH-type splicing regulatory protein</i>	14,28715	20,01212	24,21427	0,00029	0,983257
<i>hypothetical LOC290577</i>	16,195	13,41628	10,46962	0,009415	0,983257
<i>olfactomedin-like 1</i>	50,53002	55,53484	81,90794	0,007683	0,983257

protein kinase C, beta	13,84937	18,20299	25,90468	0,001265	0,983257
pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2	17,00592	19,29449	28,35257	0,006696	0,983257
RNA binding motif protein 12B	34,92145	31,67487	59,20791	0,006104	0,983257
similar to 2810022L02Rik protein	25,84913	39,77893	40,12358	0,008567	0,983257
similar to 2810022L02Rik protein	50,07711	75,9368	77,95803	0,009822	0,983257
similar to HSPC288	12,13657	12,79321	16,96425	0,006897	0,983257
similar to UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2	8,862345	9,499084	13,81018	0,00243	0,983257
similar to Docking protein 5 (Downstream of tyrosine kinase 5) (Protein dok-5)	95,90821	69,56233	46,95201	0,009334	0,983257
similar to MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4	79,12705	93,44614	108,6217	0,006356	0,983257
Rho family GTPase 3	11,82672	8,604598	14,64583	0,002357	0,983257
ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	72,7504	64,68975	39,60423	0,002775	0,983257
Rtf1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)	110,3286	152,196	115,4496	0,009686	0,983257
SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	9,034761	14,05801	14,79662	0,000675	0,983257
SPEG complex locus	11,52415	13,48559	19,02269	0,007139	0,983257
supervillin	43,6624	45,54157	25,49094	0,00835	0,983257
Thymine-DNA glycosylase	6,805984	7,026786	9,153539	0,006721	0,983257
toll-like receptor 4	14,10538	9,485375	20,15052	0,008964	0,983257
tocopherol (alpha) transfer protein-like	7,322259	7,194945	10,83937	0,003454	0,983257
ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1	171,689	142,2674	119,9715	0,007852	0,983257
WW domain binding protein 2	20,57082	20,57702	15,58811	0,008284	0,983257

<i>xylosyltransferase II</i>	25,80977	31,83981	37,34483	0,004738	0,983257
<i>zinc finger protein 143</i>	59,82538	42,6255	40,21574	0,007683	0,983257

Tablo 8: SOL ve EDL kaslarından elde edilen RNA'lar bir havuzda toplandığında gruplar arasında farklılık gösteren 3 belirgin genin ifadesi (P=0.01).

	Kontrol	OVX	OVX-TNF	P-değeri	FDR
<i>Empty spiracles homeobox 2</i>	23,356	39,330	39,46	0,0002	0,983
<i>KH-type splicing regulatory protein</i>	14,287	20,012	24,2142	0,0002	0,983
<i>SPEG complex locus</i>	11,524	13,485	19,022	0,0006	0,983

Kontrol grubu ile OVX grubu arasında fark görülen genler Tablo 9'da verilmiştir.

Kontrol grubu ile OVX grubu arasında MAPK sinyal yolağı yerel adezyon, insülin sinyal yolağı, *natural killer* hücre güdümlü sitotoksiste, VEGF sinyal yolağı, kalsiyum sinyal yolağı, Gap bileşkesi, GnRH sinyal yolağı, inositol fosfat metabolizması, uzun süreli depresyon, uzun süreli potensiyasyon, fosfatidilinositol sinyal sistemi, tat iletimi, Wnt sinyal yolağı, *fatty acid* metabolizması, PPAR sinyal yolağı, IFN alfa sinyal yolağı, sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, Jak-STAT sinyal yolağı, toll-like reseptör sinyal yolağı, immünoloji, pürin metabolizması, pirimidin metabolizması, gen düzenlenmesi, farmakoloji, transkripsiyon, ATP sentezi, oksidatif fosforilasyon, PPAR sinyal yolağı, TGF-beta sinyal yolağı, gelişme, glikan yapısı-biyosentezi 1, heparan sülfat biyosentezi ve ağrı duyusunu transkripsiyonel düzenleyici DREAM ile düzenleyen molekülde fark bulunmuştur.

Tablo 9: Kontrol grubu ile OVX grubu arasında fark görülen genler.

	Kontrol	OVX	Değişim	P değeri
<i>similar to Docking protein 5 (Downstream of tyrosine kinase 5) (Protein dok-5)</i>	27,6402	16,33223	1,692371	0,005
<i>cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 1</i>	38,41403	26,63225	1,442388	0,004
<i>zinc finger protein 143</i>	59,82538	42,6255	1,403512	0,003
<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9</i>	17,68761	12,67125	1,395885	0,005
<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 2</i>	43,62557	31,33126	1,392398	0,007

<i>phospholipase C, beta 2</i>	24,10499	17,93684	1,343881	0,01
<i>acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain</i>	15,1874	11,34753	1,338388	0,01
<i>interferon (alpha, beta and omega) receptor 1</i>	6,582301	4,922467	1,337196	0,004
<i>galanin-like peptide</i>	14,01097	10,69052	1,310597	0,006181
<i>cartilage associated protein</i>	14,23739	10,92832	1,302798	0,009331
<i>zinc finger and BTB domain containing 10</i>	7,679924	5,928977	1,29532	0,008718
<i>leucine rich repeat containing 4B</i>	9,920387	7,719256	1,285148	0,007879
<i>uroplakin 3A</i>	12,46507	9,808255	1,270876	0,007687
<i>salvador homolog 1 (Drosophila)</i>	10,74342	8,469081	1,268547	0,007318
<i>deoxycytidine kinase</i>	5,808773	4,620528	1,257166	0,009009
<i>adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit</i>	10,82279	8,660793	1,24963	0,009587
<i>a disintegrin and metallopeptidase domain 1a</i>	32,30462	26,52409	1,217935	0,0089
<i>syntaxin 1A (brain)</i>	7,540469	9,924686	0,759769	0,009996
<i>myosin IF</i>	11,3539	15,12167	0,750836	0,008111
<i>X-linked myotubular myopathy gene 1</i>	30,4254	41,72512	0,729187	0,002948
<i>Rtf1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. Cerevisiae)</i>	110,3286	152,196	0,724912	0,000997
<i>similar to RIKEN cDNA 2310007F12</i>	29,02819	40,61486	0,714719	0,005004
<i>KH-type splicing regulatory protein</i>	14,28715	20,01212	0,713925	0,004485
<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1</i>	41,73221	59,03632	0,70689	0,006464
<i>melanoma antigen, family H, 1</i>	28,78277	41,24327	0,697878	0,006273
<i>AT hook, DNA binding motif, containing 1</i>	22,38525	32,2544	0,694022	0,009961
<i>ubiquitin C</i>	3887,136	5631,036	0,690306	0,006689
<i>Bone morphogenetic protein 6</i>	36,2194	53,22079	0,68055	0,008626
<i>heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1</i>	84,40928	125,2596	0,673875	0,001267
<i>cAMP responsive element modulator</i>	87,98862	132,525	0,66394	0,003123
<i>similar to 2810022L02Rik protein</i>	50,07711	75,9368	0,659458	0,004751
<i>similar to 2810022L02Rik protein</i>	25,84913	39,77893	0,64982	0,007436
<i>cartilage intermediate layer protein 2</i>	23,82064	37,01182	0,643596	0,00405

<i>SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1</i>	9,034761	14,05801	0,642677	0,006975
<i>apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 2</i>	20,38512	32,87091	0,620157	0,006555
<i>similar to homeobox-containing transcription factor</i>	13,98685	22,57044	0,619698	0,00431
<i>Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1</i>	22,75402	37,71451	0,603323	0,001735
<i>PHD finger protein 12</i>	19,35256	32,10465	0,602796	0,002553
<i>empty spiracles homeobox 2</i>	27,94202	46,77296	0,597397	0,009548
<i>doublesex and mab-3 related transcription factor 2</i>	23,35692	39,33081	0,593858	0,000236
<i>similar to RIKEN cDNA 1200009O22; EST AI316813</i>	40,0202	71,37478	0,560705	0,007993
<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1</i>	14,46831	27,0193	0,535481	0,008917
<i>Bone marrow stromal cell antigen 2</i>	23,16211	46,60405	0,496998	0,003407

Ayrıca hızlı ve yavaş kas lifleri arasında dönüşme olup olmadığını tespit etme amaçlı sabit olarak ekspresyon gösterdiği bilinen hızlı ve yavaş kas liflerine özgü birkaç proteinin ekspresyonlarına bakılmıştır. Buna karşın MyoD molekülünde gruplar arası değişiklik saptanmamıştır.

Gerçek-Zamanlı PZR Gen İfade Analizi

Global gen ifade analizi ile alınan gen ifade profil sonuçları öncelikli olarak atrofi yolaklarında farklılık gösteren 6 hedef (p65, p50, TNF α , MyoD, Bcl3, Crel) ve array sonuçları arasından seçilen 2 gen (R-spondin 3 homolog, jun oncogene) için gerçek-zamanlı PZR (GZ-PZR) kullanılarak doğrulanmıştır.

GZ-PZR için kullanılan primer dizileri yöntem kısmında belirtildiği üzere yaklaşık 120 baz uzunluğunda olacak şekilde dizayn edilmiş ve erime sıcaklıkları yaklaşık 57-59°C arasına ayarlanmıştır. Aynı zamanda olası bir genomik DNA kontaminasyonuna karşı primer çiftleri farklı ekzonları kapsayacak şekilde seçilmişlerdir.

Tablo 10'da kullanılan primer çiftleri ve elde edilen PZR ürün uzunlukları verilmektedir:

Tablo 10. Hedef genler için GZ-PZR analizinde kullanılmak üzere tasarımı gerçekleştirilen primer çiftleri ve PZR ürün uzunlukları.

p65		122 bp
p65_fwd	ACCGGTCCGCGGTGAGAG	
p65_rvs	CAAAGTCTTCCGATCTGACTGCG	
p50		124 bp
p50_fwd	AAGGCCCGTCCCACGGA	
p50_rvs	CCATTTGTGACCAACTGAACGATAAC	
TNFa		123 bp
TNFa_fwd	CCAGCGCAGACCTCCCG	
TNFa_rvs	GTTTCTTCATAGGTTGGGGGTGC	
Bcl3		125 bp
Bcl3_fwd	CTCACTGCGTGGCCAGGC	
Bcl3_rvs	AATCATGGAGTAGGGGTGAGTAGGC	
CRel		126 bp
CRel_fwd	TGAGCACACTGCCTCATGGGAC	
CRel_rvs	CAAATCCTCAAGCCCAGCATTAC	
Rspo3		127 bp
Rspo3_fwd	GCCAGCAACCATACCATGGAATG	
Rspo3_rvs	GGACCCGTGTTTCAGTCCCTCTT	
Jun oncogene		121 bp
Jun_fwd	GCTCGGGGTCCCCATCCA	
Jun_rvs	AGCGCGGGACGCATGC	

Global gen ifade analizi için kullanılan cDNA örneklerinden yukarıda belirtilen primer dizileri kullanılarak PZR yapılmış ve karşılaştırmalı kantitasyon verileri elde edilmiştir. Bu veriler Tablo 11'de sunulmaktadır.

Tablo 11. Hedef genler için karşılaştırmalı GZ-PZR sonuçları. Sonuçlar kontrol gruplara göre % değişikliği göstermektedir.

Gen	SOL		EDL	
	OVX	OVX-TNF	OVX	OVX-TNF
P65	6.05	4.22	8.71	7.25
P50	-1.07	-0.15	-0.24	3.16
TNFa	-3.59	0.72	-0.63	0.63
Bcl3	0.43	0.08	-0.78	-0.35
CRel	-2.72	0.45	-1.89	0.14
Rspo3	-1.31	-6.01		
Jun	2.40	1.79		

Gerçekleştirilen GZ-PZR sonuçları array ile alınan sonuçları büyük ölçüde doğrular niteliktedir. p50, Bcl3, C-Rel ve TNF-alpha genleri için SOL ve EDL kaslarında kontrol ve OVX gruplarında istatistiksel olarak farklı sayılabilecek bir fark gözlenmemiştir. p65 geni ise SOL ve EDL kaslarda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında göreceli bir artış göstermiştir. SOL kaslarında global gen ifade analizi sonuçlarına göre farklılık gösteren iki adet gen seçilmiş ve array sonuçlarını doğrular nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. SOL kasta Rspo3 geni OVX ve OVX-TNF gruplarında göreceli bir azalma, Jun onkogeni ise artış göstermiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçanlarda ovariyektomi sonrası iskelet kası işlevinde azalma, yapısal bozulma ve moleküler değişiklikler gözlenmiştir. Bu bulgular daha önce yürütülen çalışmalarla örtüşmektedir (FISHER, 1998; MORAN, 2006). Bu çalışmaya ön çalışma olarak yürüttüğümüz deneylerde OVX sıçan modelinde EDL ve SOL kaslarının maksimum kasılma güçlerinde düşüş olduğunu ve TNF-alfa antagonistinin hızlı kaslarda bu düşüşü engellediğini, tetanik kasılma eşiklerindeyse her iki tip kasta da bir düşüş olduğunu ve TNF-alfa antagonistinin bu düşüşü engellediğini görmüştük (DAĞDEVİREN, 2011).

Kas atrofisi üzerine yürütülen daha önceki çalışmalarda TNF-alfa üzerinden işleyen ve TNF-alfa'yı hiç kullanmayan olmak üzere 2 adet kas atrofisi ve işlev kaybı üst yolağı tanımlanmıştır (HUNTER, 2002; HUNTER, 2004; ZHANG, 2007; GLASS, 2005; MCKINNEL, 2004). Bu çalışmanın bulguları OVX sonrası sıçanlarda oluşan iskelet kası bozunumlarında TNF-alfa yolağının kilit bir rol oynadığını ve TNF-alfa antagonistinin bu değişimi engellemede önemli bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ve yine buna benzer distrofik kaslarda *infiximab*'ın olumlu etkisini vurgulayan bir çalışmada (GROUNDS, 2004) TNF-alfa antagonistinin hem yavaş hem de hızlı kasılan kaslarda olumlu etkisi gösterilmiştir. İşlevsel sonuçlara baktığımızda TNF-alfa antagonistinin etkisinin hızlı kasılan EDL kaslarında daha fazla olduğu görülür. Bu sonucun EDL ve SOL kasları arasındaki kas lifi tipi içeriği farkından kaynaklanması mümkündür. Sprague-Dawley sıçanların SOL kaslarının %83 oranında Tip I lif (yavaş) ve %17 oranında Tip II (hızlı) lif içerdiğini, EDL kaslarınınsa ağırlıklı Tip II (hızlı) kas liflerinden oluştuğu bilinir (ARMSTONG, 1984). TNF-alfa antagonistinin etkisinin ise işlevsel sonuçlara göre hızlı kas liflerinde daha belirgin olduğunu söyleyebiliriz.

Ovariyektominin vücut yağ ağırlığında ve insulin direncinde artışa sebep olduğu bilinmektedir (AHMED-SOROUR, 1980). Bu çalışmada OVX sonrası kas ağırlığıyla birlikte tüm vücut ağırlığında da bir artış gözlemlendi. OVX grubunda kas ağırlığının vücut ağırlığına oranı artmakla birlikte bu artış TNF-alfa antagonisti uygulanmasıyla engellenmiştir. Tanım olarak atrofik bir durumdan ağırlık kaybı beklense de daha önceki çalışmalarla aynı çizgide olarak OVX sonrası iskelet kası kütlesinde artış görülmekle birlikte bu artış iskelet kasına özgü bir artış değil, insülin ve yağ dengesinin bozulmasıyla ilgili östrojen kaybına bağlı tüm organlara özgü bir artış olarak görülmelidir (BOOTH, 1969; MCCLUNG, 2006; FISHER, 1998). Kas kütlesindeki artış sadece östrojenin kas üzerindeki doğrudan etkisiyle ilgili olmaktan çok tüm organ ağırlıklarındaki artışa paraleldir (FISHER 1998).

TNF-alfa antagonisti sıçanlarda OVX sonrası iskelet kası ağırlığındaki artışı engellemiştir. Bu da bize OVX sonrası iskelet kaslarındaki yapısal bozukluk ve moleküler biyolojik değişikliklerin arkasında TNF-alfanın rolünün olabileceğini göstermektedir.

Kontrol grubu dışındaki gruplarda femoral KMY'da düş saptanmıştır. Uterin atrofi de OVX operasyonunun başarılı olduğunu gösteren bir yöntemdir. Ovariyektomi geçiren sıçanların hepsinin rahminde önemli oranda atrofi gözlenmiş ve OVX başarısı kanıtlanmıştır (Hidaka, 2006). Daha önceki çalışmalarda TNF alfa antagonistinin KMY'undaki düşüşü etkilemede olumlu bir etkisi olduğu gösterilmiş (SERIOLO, 2006) ancak bu çalışmada böyle bir etkiye rastlanmamıştır. Bunun sebebi doza bağlı etki olarak düşünülebilir. Bu çalışmada 10µg/g haftalık doz uygulanmıştır. Doz daha önce kasta pozitif etkisi görülen maksimum doz olarak hesaplanmıştır (GROUNDS, 2004).

HE boyama yapılmış kesitlerin histolojik analizlerinde OVX ve OVX-TNF gruplarının EDL kaslarında kas liflerinde ayrışma ve çeşitli boyutlarda liflere rastlanmıştır. Bu bozulmalar atrofının ilk aşamalarında görülebilecek bir tabloyu işaret ediyor olabilir. OVX grubunun EDL kaslarında merkezi çekirdeklere rastlanmıştır. Merkezi çekirdekler myopatilere bir işaret olarak görülebilir (DUBOWITZ, 2007). OVX grubu EDL kaslarında bazı bölgelerde yer yer atrofik lif öbeklerine rastlanmıştır.

OVX grubunun SOL kaslarının HE boyama yapılmış kesitlerinde kas liflerinde ayrışma ve çeşitli büyüklüklerdeki liflere rastlandı. OVX-TNF grubunda da değişik boyutlardaki lifler ve merkezi çekirdek bulunmaktaydı. OVX ve OVX-TNF grubunun her ikisinde de yağ hücresi infiltrasyonu gözlemlendi. Bu bulgular *infiximab* uygulamasının yapısal değişiklikleri engellemede etkili olmadığını göstermektedir.

NADH-TR boyanması sonuçları kas lifi ayrımını yapmamıza olanak tanıdı. Kontrol grubunun EDL kaslarında hızlı kasılan Tip II fiberleri ağırlıkta gözlemlenirken OVX ve OVX-TNF gruplarında yavaş kasılan Tip I fiberleri sayımlarda ağırlık gösterdi. Atrofi ve hipertrofi hesaplamaları genelde kesit alan veya az çap üzerinde yapılmaktadır (DUBOWITZ, 2007). Bu çalışmada hem kesit alan hem de çap ölçülmüştür. Değerlendirmeler sonucu Tip I liflerinin EDL kaslarında OVX ve OVX-TNF gruplarında kontrol grubuna oranla sayıca arttığı gösterildi. Bu artış SOL kaslarında gözlemlenmedi. SOL kasındaki Tip II kas lifleri sayıca çok az olduğu için istatistik uygulanmadı. Tip I liflerindeki alansal artışı organlardaki genel artışın olmamasına veya Tip II fiberlerindeki kompanse eden hipertrofiye bağlı olarak açıklayabiliriz. Bu da Tip II spesifik bir atrofiyi işaret eder. Tip II ye özgü atrofi osteomalazi kasta kaşeksi gibi pek çok durumda görülen özgün olmayan bir bulgudur (MASTAGLIA, 1992). Hipertrofi bazen iskelet kası hacmini yağ infiltrasyonu ile artmasıyla oluşan ve genelde tümör olgularında gözlemlenen inflamatuvar yolağın işlediği pseudohipertrofiyle karıştırılabilir (MASTAGLIA, 1992).

Daha önceki bir çalışmada p65 molekülü aktivasyonunun TNF-alfa yolağıyla tetiklenen kaşektik atrofide arttığı ve kullanılmama atrofisinde sabit kaldığı gösterilmiştir (HUNTER, 2002). Ayrıca p65 molekülü hem sitoplazmada hem çekirdekte bulunan bir molekül olup, aktivasyonu sonucu sitoplazmadan çekirdeğe lokalize olmaktadır. İmmünohistokimya kesitlerinde p65 molekülünün artış gösterdiği ve OVX ve OVX-TNF gruplarında çekirdeğe doğru yöneldiği gösterilmiştir. Bu bulgu OVX sıçanların kaslarında görülen bozunumun TNF-alfa yolağıyla bağıntılı olduğunu desteklemektedir. Ayrıca GEN İFADESİ çalışmalarında OVX grubunda kontrol grubuna oranla p65 molekülünün ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar OVX sonrası iskelet kaslarında gelişen atrofının TNF-alfa yolağı üzerinden gidiyor olması gerektiğini vurgulamaktadır. OVX-TNF grubunun SOL kaslarında immünohistokimya kesitlerinde OVX grubuna oranla daha az p65 işaretlenmesi görülmüştür. Bu etki *infleximab* uygulanmasının p65 üzerinden gerçekleşen kas yıkımını engelliyor olabileceğini önermektedir. P65 ekspresyonlarına bakıldığında da SOL kasının da EDL kasının da her iki grubunun arasında değerler verdiği görülmektedir. Bu bağlamda immünohistokimya ve GEN İFADESİ sonuçları örtüşmektedir. TNF-alfa NF-kB proteinlerinin yeniden üretilmesini sağlamak yerine onları çekirdeğe yönlterek etkinleştirme görevlidir (THANOS, 1995). Bu yüzden p65'in çekirdekte daha yoğun boyanması gen ifadesi deneylerinde aşırı belirgin bir artış olmamasına karşılık anlamlı olabilir.

Sitoplazmik olarak immünohistokimyada işaretlenen p50 molekülünde EDL kaslarında hiçbir grup arasında bir fark tespit edilmemiştir. P50 molekülü her iki yolakta da görev alabilecek bir molekül olup aralarında vurgulanma farkı göstermemektedir (HUNTER, 2002). OVX-TNF grubunun SOL kasının işaretlenmesinin diğer gruplardan az olduğu görülmüştür. GEN İFADESİ sonuçlarında da gruplar arasında hiçbir farka rastlanmamıştır. Bu bağlamda GEN İFADESİ ve immünohistokimya sonuçları örtüşmektedir. P50 molekülü de yine etkinleşme sonucu her iki atrofide de sitoplazmadan çekirdeğe lokalize olan bir moleküldür (HUNTER, 2006). P50 immün işaretlenmesinin OVX-TNF grubunun SOL kaslarında daha az olması olumlu bir yıkımı engelleyici etki olarak yorumlanabilir.

MyoD molekülü kas farklılaşmasında ve myotüp oluşumunda önemli bir moleküldür ve kas yıkımı sırasında ubiquitin ligaz atrojin veya MAFbx tarafından yıkıldığı bilinmektedir (ZHANG, 2007). Diğer bir deyişle MyoD varlığı kas rejenerasyonunu işaret etmektedir. İmmünohistokimya sonuçlarına göre MyoD OVX ve OVX-TNF gruplarının SOL kaslarında artmış EDL kaslarında ysa sadece OVX grubunda artış görülmüştür. Bu bulgular OVX grubunda bir rejenerasyonu işaret etmekte ve merkezi çekirdek bulgusuyla örtüşmektedir. Ama bu bulgu kas kaşekşisindeki olumsuz Nf-kB etkisi beklentimizden farklıdır (GUTTRIDGE, 2000).

C-Rel molekülü kullanılmama atrofisinde ekspresyonu artan bir moleküldür (HUNTER, 2002). İmmünohistokimya kesitlerinde C-Rel molekülünün boyanma şiddetinin OVX-TNF grubunun SOL kaslarında arttığı görülmüştür. EDL kaslarındaysa gruplar arası bir fark gözlemlenmemiştir. Gen ifadesi sonuçlarına baktığımızdaysa her iki kasta da gruplar arası bir ekspresyon farkına rastlanmamıştır. Bu bağlamda gen ifadesi ve immünohistokimya sonuçları örtüşmektedir. C-Rel molekülü kullanılmama atrofisinde artış gösteren kaşektik atrofideyse sabit kalan bir molekül olduğu için bu sonuçlar yine TNF-alfa yolağının etkili olduğunu önermektedir (HUNTER, 2002).

Bcl3 molekülü de yine aynı şekilde gruplar arasında immünohistokimya işaretlenmelerinde ve gen ifadesi sonuçlarında bir fark göstermemiştir. Bu molekül de C-Rel molekülü gibi kullanılmama atrofisinde artış gösteren bir moleküldür (HUNTER, 2002). Bu bağlamda yine gen ifadesi ve immünohistokimya sonuçları örtüşmektedir ve TNF-alfa yolağının etkisini işaret etmektedir.

TNF-alfa molekülü daha önceki çalışmamızda (DAĞDEVİREN, 2011) immünohistokimya sonuçlarına göre OVX gruplarında artış göstermiş ve OVX-TNF gruplarında kısmi düşüş belirlenmiştir. GEN İFADESİ sonuçlarında görüldüğü üzere OVX TNF-alfa reseptörü ekspresyonunda OVX grubunda kontrol grubuna oranla bir artmaya neden olmuştur. Bu TNF-alfa miktarının artmış olabileceğini işaret etmektedir. OVX-TNF grubunda ise antagonist uygulanması diğer gruplardan anlamlı bir farklılığa yol açmamıştır. Reseptör ekspresyonu EDL kaslarında ancak marjinal derecede SOL kaslarındaysa sadece düşük seviyededir. Gen ifadesi sonuçları OVX'de TNF-alfa varlığındaki artış açısından immünohistokimya sonuçlarıyla örtüşmektedir. Ancak SOL kaslarında *infiximab* uygulanmasıyla protein ekspresyonunda bir düşüş olma ihtimaline karşın EDL kaslarında antagonist uygulanmasının etkisi görülmemektedir. Bu sonuçlar yine bize TNF-alfa yolağının etkisi olabileceğini önermektedir.

Elektron mikroskopi bulgularına göre EDL kasında mitokondri sayıları beklendiği üzere kontrol grubunda normaldir. Yavaş kasılan kasların aerobik solunumu tamamlaması için çok sayıda mitokondriye ihtiyacı vardır. Kontrol grubunun yavaş kasılan SOL kasları aerobik solunum yapan bir kastan beklendiği üzere sarkoplazmik retikulumun altında yüksek oranda mitokondri kapsamaktadır ve düzgün konumda Z bantları vardır. Sarkomer yapısı OVX grubunun EDL kaslarında çok az oranda yapısal bozulan gösterse ve mitokondrileri hafif şişmiş bir görüntü sunsa da genel olarak kas fiberlerinin yapısı normal olarak değerlendirilmiştir. OVX grubunun SOL kasları kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda mitokondri içerdiği için enerji kaybına bağlı olarak bir fonksiyonel düşüş de akla gelebilir. Yine de OVX grubunda da SOL kaslarının genel yapısında belirgin bir bozulma görülmemiştir. Ancak OVX grubunda da OVX-TNF grubunda da kas lifleri kontrol grubuna oranla biraz daha

kalın gözlenmiştir. Bu kalınlık sıvı içeriğindeki artışa bağlı olabileceği gibi gerçek kas artışına da bağlı olabilir. Lif içlerindeki zaman zaman gözlemlenen boşluklarsa lif bozulumuna bir işaret olabilir. OVX-TNF grubunun hızlı kasılan EDL kasları homojen bir mitokondri dağılımı ve sayısı ile sağlıklı şeklini korumuştur. Fakat liflerin arasında görülen boşluklar OVX-TNF alfa grubunda da karşımıza çıkmıştır. Bu sonuç ovariyektomi sonrası kasları ultra yapısal korunumunu sağlamada *infiximab*ın da yeterli olmadığını göstermiştir. OVX-TNF grubu SOL kaslarının yüksek miktarda glikojen ve mitokondri içerdiği ve belirgin yapıda krista ve T-tubulus yapılarının bulunduğu gözlemlenmiştir. Kas fiberi atrofisinde hızlı bir protein yıkımı yer alsaydı da morfolojik olarak bunu görmek ve lizozom sayısından bu sonuca varmak mümkün değildir (MASTAGLIA, 1992). Lizozom sayısında artış bu çalışmada da gözlenmemiştir.

Literatüre göre TNF-alfa antagonisti dozu deneysel uygulamalarda intrperitoneal uygulamalarda 10 µg/g civarı olarak kullanılmıştır (GROUNDS, 2004; BARBUIO, 2007; DEMİR, 2006; MORIWAKI, 2007; CURY, 2008; BAHÇECİOĞLU, 2008; KURT, 2009; REMICADE PI, US, 2006). Klinik uygulamalarda *infiximab* için insan dozu çeşitli otoimmün hastalıklar için uygulama başına 5.0–10.0 mg/kg olarak belirlenmiştir (BARBUIO, 2007; REMICADE PI, US, 2006). Çeşitli değişik hastalıkların uygulamalarında sıçanlar üzerinde farklı dozlar denenmiştir (0.5µg/g x5 otoimmün üveitis DEMİR, 2006; 1.25µg/g/hafta x12 diyabet MORIWAKI, 2007; 20 µg/gx1 IBD CURY, 2008; 2µg/g/hafta x5 Hepatik fibroz BAHÇECİOĞLU, 2008; 5µg/gx1 omurga incinmesi KURT, 2009). Bu çalışmada biz daha önce distrofide kaslarda olumlu etkisi gözlemlenen maksimum dozu baz alarak ve insan dozlarıyla sıçan dozlarının birbirine çevrilmesini baz alan bir çalışmada en etkin düşük dozu göze alarak uygulama miktarımızı 10µg/g olarak belirledik (GROUNDS, 2004; BARBUIO, 2007). *Infiximab*ın piyasaya sürülmeden önceki hayvan deneylerinde yapılan bir dozaj çalışmasında da insan TNF-alfası sentezleyen bir transgenik farede etkin terapötik dozun 10µg/g olarak belirlendiği bilinmektedir (BLACK, 1998). Bu çalışmanın bir kısıtı henüz doza bağlı etki çalışmalarının yürütülmemiş olmasıdır. Bu çalışma ileride yapılabilecek doza bağlı tedavi çalışmalarına bir veri tabanı oluşturacaktır.

SONUÇ

Bu araştırmada postmenapozal bir osteoporoz modeli olan OVX sıçanların iskelet kasları geniş bir açıdan incelenmiştir. İşlevsel yanıtlar, morfolojik ve histolojik yapı, ultra yapısal korunum, immünohistokimyasal ve ekspresyon düzeyinde farklılıklar incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu bilgiler sonucunda OVX uygulanan sıçanların iskelet kaslarında gerek işlevsel gerek yapısal gerek ekspresyon düzeyinde ve proteinlerin lokalizasyonlarında çeşitli farklılıklar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarla da örtüşmektedir (FISHER, 1998; MORAN, 2007; CHEN, 2006). Bu bulgular osteoporoz tanı ve tedavisinde kasların da hesaba katılması gerektiğini vurgulamakta ve kliniğe farklı bir bakış açısı getirmektedir. Araştırmanın sonuçlarına göre TNF-alfa antagonisti uygulanması iskelet kasındaki OVX'e bağlı işlevsel kaybı ve kütle artışını engellemektedir. Bu etki hızlı kasılan kaslarda daha belirgindir. Bu sonuçlar osteoporotik hastalarda görülen kas gücü kaybı ve istenmen kilo artışı için tedavi açısından sonraki çalışmalara örnek oluşturacak önemli bir ilk çalışmadır. Ancak bu iyileştirme yapısal bozulmaları engellemede etkili değildir. Yapısal etkileri engelleme amacıyla çeşitli ek araştırmalara gerek vardır, bunların nedeni sonraki araştırılmalarda aydınlatılmalıdır. Yapılan immünohistokimya ve gen ekspresyonu çalışmalarının sonuçları kaslardaki OVX sonrası bu bozunmanın kullanılmama atrofisi değil kaşektik atrofi yolağı üzerinden gittiğini önermektedir. Bu veriler yerleşik bir yaşam biçiminden kaynaklandığını düşünerek görmezden geldiğimiz bir sonucun potansiyel nedenleri ve hedef tedavilerine yeni bir yaklaşım getirmektedir. Özetlemek gerekirse OVX sonrası iskelet kaslarında bir işlev kaybı ve yapısal çeşitli farklılıklar gözlenmektedir. TNF-alfa antagonisti *infiximab* bunları engellemede kısmen etkilidir. Osteoporotik deneklerde daha önce de gözlemlendiği söylenen bu atrofi/bozunma kullanılmama atrofisine bağlı olarak değil TNF-alfa yolağıyla tetiklenen ve Nf-kB yolağı üzerinden ilerleyen kaşektik kas atrofisi yoluyla oluşmaktadır. Menapoz sonrası kadınlarda görülen kas kalitesinde bozulma, sadece durağan bir yaşam biçimine bağlı değil kemik erimesiyle birlikte gelişen bir kas kaybına bağlıdır. Bu araştırma daha önce aydınlatılmamaış olan postmenapozal hastalardaki kas bozuluma nedensel ve moleküler olarak bir ışık tutmuş, tedavi yollarının geliştirilmesi için bir kapı açmıştır. Bu çalışmada ayrıca şuanda piyasada otoimmün ve romatizmal hastalıklara karşı kullanılmakta olan ve daha önce kemik kaybını engellemede etkili olduğu ve distrofik kaslara da iyi geldiği önerilmiş olan TNF-alfa antagonisti *infiximab*ın postmenapozal osteoporotik hastaların iskelet kaslarında ek bir olumlu etkisi de kanıtlanmıştır. Bu çalışmanın

devamında *infiximab*ın kaslar üzerindeki olumlu etkisi doz etkileri, çeşitli yaş gruplarında etkileri, yan etkileri karşılaştırılarak ve denek grupları genişletilerek çalışılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. AHMED-SOROUR, H., Bailey, C. J., Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis: Interaction with insulin, glucagon and epinephrine, *Horm Res*, 13:396-403, (1980).
2. ARMSTRONG, R. B., Phelps, R. O., Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171:259-72, (1984).
3. BAHÇEÇİOĞLU, I. H., Koca, S. S., Poyrazoglu, O. K., Yalniz, M., Ozercan, I. H., Ustundag, B., Sahin, K., Dagli, A. F., Isik, A., Hepatoprotective Effect of Infliximab, an Anti-TNF- α Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis. *Inflammation* 31: 4 (2008).
4. BARBUIO, R., Milanski, M., Bertolo, M. B., Saad, M. J., Velloso, L. A., Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet, *J Endocrinol* 194:3:539-50, (2007).
5. BLACK, L. E., Memorandum: Pharmacology Review of the infliximab BLA, *Clinical Trial Analysis*, Centocor Inc., (1998).
6. BOOTH, F. W., Tipton, C. M., Effects of training and 17- β estradiol upon heart rates, organ weights, and ligamentous strength of female rats, *Int Z Angew Physiol*, 27:187-97, (1969).
7. CARSON, J.A., Nettleton, D., Reecy, J.M., Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy, *FASEB J*, 16:207-9, (2002).
8. CHEN, H., Yao, X. F., Emura, S., Shoumura, S., Morphological changes of skeletal muscle, tendon and periosteum in the senescence-accelerated mouse (SAMP6): A murine model for senile osteoporosis, *Tissue & Cell*, 38:5:325-35, (2006).
9. COMPSTON, J., Cooper, A., Cooper, C., Francis, R., Kanis, J. A., Marsh, D., McCloskey, E. V., Reid, D. M., Selby, P., Wilkins, M., on behalf of the National Osteoporosis Guideline Group, Guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and men from the age of 50 years in the UK, *Maturitas*, 62:105-8, (2009).
10. CURY, D. H. B., Costa, J. E., Irika, K., Mijji, L., Garcez, A., Buchiguel, C., Silva, I., Sipahi, A., Protective Effect of Octreotide and Infliximab in an Experimental Model of Indomethacin-Induced Inflammatory Bowel Disease, *Digestive Diseases and Sciences*, 53:9 (2008).
11. DAĞDEVİREN S., Kandilci, H.B., Uysal, B., Zeybek, N.D., Korkusuz, P., Gümüsel, B., Korkusuz, F., Tumor necrosis factor-alpha antagonist administration recovers skeletal muscle dysfunction in ovariectomized rats, *J Orthop Res*, 29:275-80, (2011).
12. DEMİR, T., Gödekmerdan, A., Balbaba, M., Türkçüoğlu, P., İlhan, F., Demir, N., The effect of infliximab, cyclosporine A and recombinant IL-10 on vitreous cytokine levels in experimental autoimmune uveitis, *Indian J Ophthalmol*, 54:4:241-5, (2006).
13. DERAIVE, W., Eijnde, B. O., Ramaekers, M., Hepsel, P., Soleus muscles of SAMP8 mice provide an accelerated model of skeletal muscle senescence, *Experimental Gerontology*, 40:562-72, (2005).
14. DOĞRU, M. T., Aydos, T. R., Aktuna, Z., Korkusuz, P., Zeybek, D., Görgü, N., Korkut, O., Basar, M. M., The effects of beta-blockers on endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat corpus cavernosum, *Urology*, 75:3:589-97, (2010).
15. DUBOWITZ, V., Sewry, C. A., Muscle Biopsy: A Practical Approach, *Elsevier*, Philadelphia, (2007)
16. FISHER, J. S., Hasser, E. M., Brown, M., Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle, *J. Appl Physiol*, 85:1316-21, (1998).

17. FRENETTE, J., Cai, B., Tidball, J. G., Complement activation promotes muscle inflammation during modified muscle use, *Am J Pathol*, 156: 2103-10, (2000).
18. FROST, H. M., Changing concepts in skeletal physiologie:Wolff's Law, the Mechanostat and the "Utah Paradigm", *J Hum Biol*, 10:599–605, (1998).
19. GEYİKOĞLU, F., Turkez, H., Aslan, A., The protective roles of some lichen species on colloidal bismuth subcitrate genotoxicity, *Toxicol Ind Health*, 23:487-92, (2007).
20. GHOSH, S., May, M. J., Kopp, E B., NF-kappaB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, *Annu Rev Immunol*, 16:225-60, (1998).
21. GLASS, J. D., Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways, *Int J Biochem Cell Biol*, 37:10:1974-84, (2005).
22. GROUNDS, M. D., Torrisi, J., Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis, *FASEB J*, 18:6:676-82, (2004).
23. GUTTRIDGE, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y., Baldwin, A. S., NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia, *Science*, 289:2363-6, (2000).
24. HEIKKINEN, J., Kyllonen, E., Kurttila-Matero, E., Wilen-Rosenqvist, G., Lankinen, K. S., Rita, H., Vaananen, H. K., HRT and exercise: effects on bone density, muscle strength and lipid metabolism:A placebo-controlled 2-year prospective trial on two estrogen-progestin regimens in healthy postmenopausal women, *Maturitas* 26:139-49, (1997).
25. HİDAKA, S., Okamoto, Y., Royal Jelly Prevents Osteoporosis in Rats: Beneficial Effects in Ovariectomy Model and in Bone Tissue Culture Model, *Evidence-based Compl. and Alt. Medicine*, 3:3:339-48, (2006).
26. HUNTER, R. B., Kandarian, S. C., Disruption of either the Nfkb1 or Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy, *J Clin Invest*, 114:1504-11, (2004).
27. HUNTER, R. B., Stevenson, E., Koncarevic, A., Mitchell-Felton, H., Essig, D. A., Kandarian, S. C., Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy, *FASEB J*, 16:529-38, (2002).
28. International Osteoporosis Foundation, <http://www.iofbonehealth.org/patients-public/more-topics/secondary-osteoporosis.html>, Last Access date: 05.31.2010
29. JEE, S. S., Yao, W., Overview: Animal Models of Osteopenia and Osteoporosis, *J Musculoskele Neuron Interact*, 1:3:193-207, (2001).
30. KNIGHT, D. M., Trinh, H., Le, J., Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti TNF antibody, *Mole Immuno* 30:1443-53, (1993).
31. KURT, G., Ergün, E., Cemil, B., Börcek, A. O., Börcek, P., Gülbahar, O., Ceviker, N., Neuroprotective effects of infliximab in experimental spinal cord injury, *Surg Neurol*, 71:3:332-6, (2009).
32. LANGEN, R. C., Schols, A. M., Kelders, M. C., Wouters, E. F., Janssen-Heininger, Y. M., Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB, *FASEB J* 15:1169-1, (2001).
33. LECKER, S. H., Solomon, V., Mitch, W.E., Goldberg, A. L., Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin proteasome pathway in normal and disease states, *J. Nutr*, 129:227-37, (1999).
34. LINDSAY, R., Hormone and Bone Health in Postmenopausal Women, *Endocrine*, 24:223-30, (2004).
35. MASTAGLIA, F. L., Walton, J., Skeletal muscle pathology, *Churchil Livingstone*, 1-88, 360-393, 605-621, (1992).
36. MCCLUNG, J. M., Davis, J. M., Carson, J. A., Muscle: Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats, *Exp Physiol* 92:219-32, (2007).
37. MCCLUNG, J. M., Davis, J. M., Wilson, M. A., Goldsmith, E. C., Carson, J. A., Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy, *J Appl Physiol*, 100:2012-23, (2006).

38. MCKINNELL, I. W., Rudnicki, M. A., Molecular Mechanisms of Muscle Atrophy, *Cell*, 29:119:7:907-10, (2004).
39. MORAN, A. L., Nelson, S. A., Landisch, R. M., Warren, G. L., and Lowe, D. A., Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice, *J Appl Physiol* 102:1387-93, (2007).
40. MORAN, A. L., Warren, G. L., Lowe, D. A., Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution, *J Appl Physiol* 100:2:548-59, (2006).
41. MORIWAKI, Y., Inokuchi, T., Yamamoto, A., Ka, T., Tsutsumi, Z., Takahashi, S., Yamamoto, T., Effect of TNF-alpha inhibition on urinary albumin excretion in experimental diabetic rats, *Acta Diabetol*, 44:4:215-8, (2007).
42. National Osteoporosis Foundation, Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis, Washington, DC, National Osteoporosis Foundation, (2010).
43. PARVEZ, T., Postmenopausal Osteoporosis, *JK-Practitioner*, 11:4:281-3, (2004).
44. RAISZ, L. G., Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, *J. Clin. Invest.* 115:3318-25, (2005).
45. Remicade PI, *Centocor Inc.*, PA, US, (2006).
46. SCALLON, B. J., Moore, M. A., Trinh, H., Chimeric anti-TNF alfa monoclonal antibody cA2 binds to recombinant transmembrane TNF alfa and activates immune effector functions, *Cytokine*, 7:251-9, (1995).
47. SCHÖNAU, E., Fricke, O., Muscle and Bone: a Functional Unit, *Dtsch Arztebl*, 103:50: :3414-9, (2006).
48. SERIOLO, B., Paolino, S., Sulli, A., Cutolo, M., Are there any positive effects of TNF-alpha blockers on bone metabolism?, *Rheumatismo*, 58:3:199-205, (2006).
49. STASSIJNS G., Gayan-Ramirez, G., de Leyn, P., Verhoeven, G., Herijgers, P., de Bock, V., Dom, R., Lysens, R., Decramer, M., Systolic Ventricular Dysfunction Causes Selective Diaphragm Atrophy in Rats, *Am J Respir Crit Care Med*, 158:1963-67, (1998).
50. STEVENSON, E.J., Giresi, P.G., Koncarevic, A., Kandarian, S.C., Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle, *J Physiol*, 15:33-48, (2003).
51. TAKATA, K., The nature and function of mononuclear cells on the resorbed surfaces of bone in the reversal phase during remodeling, *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 183:2:103-10, (2001).
52. THANOS, D., Maniatis T., NF-KB: A Lesson in Family Values, *Cell*, 80:529-32, (1995).
53. TURNER, A. S., Animal models of osteoporosis- necessity and limitations, *European Cells and Materials*, 1:66-81, (2001).
54. UÇAN, H., Borman, P., Keskin, D., Barça, N., Carpal collapse in patients with rheumatoid arthritis, *Clin Rheumatol*, 25:845-9, (2007).
55. UĞUR, Y., Sarı, O., Uğur, Ö., Korkusuz, P., Varoğlu, E., Arslan, N., Gürcan, N., Yıldırım, M., Sökmensüer, C., Aşan, E., Aras, T., Lack of Correlation Between Tc-99m-sestaMIBI Uptake and Cadherin Expression in Infiltrating Ductal Breast Carcinoma as Prognostic Indicators, *Annals of Nuclear Medicine*, 17: 281-7, (2003).
56. US National Institutes of Health, Osteoporosis Prevention, diagnosis and therapy, *NIH Consensus statement* 17:1-45, (2007).
57. WATTANAPERMPPOOL, J., Reiser P. J., Differential effects of ovariectomy on calcium activation of cardiac and soleus myofilaments, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 277:467-473, (1999).
58. WOLFF, J., The Law of Bone Remodeling, *Springer Inc.*, New York, (1986).
59. WRONSKI, T. J., Walsh C. C., Ignaszewski, L. A., Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats, *Bone*, 7:119, (1986).
60. ZHANG, P., Chen, X., Fan, M., Signaling mechanisms involved in disuse atrophy, *Medical Hypotheses*, 69:2:310-21, (2007).

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 109S344
Proje Başlığı: Osteoporotik Sıçan Dokularında İskelet Kası Atrofisinin İmmünohistoloji ve Moleküler Biyoloji Yöntemleriyle Araştırılması.
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Feza Korkusuz (Yürütücü), Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Çetin Kocaefe, Y. Doç. Dr. Dilara Zeybek, Berna Kankılıç, Sezin Dağdeviren (Araştırmacılar)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara 06531
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sıhhiye, Ankara 06100
Öz (en çok 70 kelime) <p>Osteoporozun iskelet kasına olası etkileri az araştırılmıştır. Osteoporozda gözlenen kas atrofisinin alt ve üst sinyal yollarının moleküler biyolojisi henüz bilinmemektedir.</p> <p>Bu çalışmada ovariyektomi (OVX) gerçekleştirilmiş sıçanların kas dokularındaki yapısal değişiklikler ve moleküler sinyal yolları immunohistokimya ve GEN İFADESİ ile araştırılmıştır.</p> <p>OVX sonucu kasta gözlemlenen işlev kaybı TNF-alfa antagonisti enjeksiyonu ile kısmen engellenebilir. Uygulama, OVX sonrası gelişen değişiklikleri azaltmada kısmen etkili olsa da kastaki yapısal değişiklikler tam olarak giderilememiştir.</p>
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.04.2010-01.04.2011
Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, İskelet Kası, TNF-alfa, Ovariyektomi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/>
<small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>

Projeden Yapılan Yayınlar:

1. **Uluslararası Makale:** Dagdeviren S, Kandilci HB, Uysal B, Zeybek ND, Korkusuz P, Gümüşel B, Korkusuz F. Tumor necrosis factor-alpha antagonist administration recovers skeletal muscle dysfunction in ovariectomized rats. J Orthop Res 2010;29:275-280. (Not: İlk proje başvurusu aşamasında önerilen deneylerden gerçekleştirilmiş ve işlevsel sonuçları kapsayan uluslararası makaledir.)
2. **Uluslararası Makale:** Dagdeviren S, Korkusuz P, Zeybek ND, Uysal B, Kocaefe Ç, Akpulat U, Yıldız Y, Korkusuz F. Histological, immunohistochemical and gene expressional analysis of the ovariectomized rat muscle and effects of TNF-alpha. (Yayına hazırlandı. Gönderilme aşamasında.)
3. **Uluslararası Bildiri:** Dagdeviren S, Zeybek ND, Korkusuz P, Akpulat U, Yıldız Y, Kandilci B, Gümüsel B, Korkusuz F. Analysis of skeletal muscle in postmenopausal osteoporotic animal model: the role of TNF-alpha. 17th International Microscopy Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 19-24 September 2010 (Abstract Book pp. L17.26)
4. **Uluslararası Bildiri:** Dagdeviren S, Korkusuz F, Zeybek ND, Korkusuz P, Kocaefe Ç, Akpulat U, Yıldız Y, Kandilci HB, Uysal B, Gümüsel B. TNF-alpha antagonist recovers osteoporotic skeletal muscle function. 2001 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Long Beach, California, USA, January 13-16, 2011 (Abstract Book pp. 97)(Poster)
5. **Uluslararası Bildiri:** Korkusuz F, Dagdeviren S, Uysal B, Korkusuz P, Zeybek ND, Akpulat U, Yıldız Y, Kocaefe Ç. Gene expression and immunohistochemical changes in skeletal muscles after ovariectomy and TNF-alpha antagonist administration in aged rats. 63th Annual Meeting of the Association of Bone and Joint Surgeons. Dublin, İrlanda, June 8-12, 2011 (Abstract Book pp. 54-56)
6. **Ulusal Bildiri:** Dağdeviren S, Kandilci B, Çetinkaya A, Uysal B, Korkusuz P, Zeybek D, Kocaefe Ç, Gümüsel B, Korkusuz F. Functional analysis of skeletal muscles in postmenopausal osteoporotic rat model and role of TNF-alpha. International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, 27-30 Haziran 2009, Ankara (Kongre kitabı sf.118) (Poster)
7. **Ulusal Bildiri:** Dağdeviren S, Kandilci B, Çetinkaya A, Uysal B, Korkusuz P, Zeybek D, Kocaefe Ç, Gümüsel B, Korkusuz F. Postmenopozal osteoporotik hayvan modelinde iskelet kasının fonksiyonel analizi ve TNF-alfanın rolü. XXI Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2009, Çeşme, İzmir (Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica 2009;43 (Supp-I):40-41.'de yayınlanmıştır.)
8. **Ulusal Bildiri:** Dağdeviren S, Zeybek D, Korkusuz P, Kocaefe Ç, Akpulat U, Yıldız Y, Kandilci B, Uysal B, Gümüsel B, Korkusuz F. Postmenopozal osteoporotik hayvan modelinde iskelet kasının değerlendirilmesi: TNF-alfa'nın rolü. 10. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, 17-20 Mayıs 2010, Çeşme, İzmir (Kongre kitabı Sf. 54; Cell & Tissue Biology Research 2010;2:58'de yayınlanmıştır.)

9. **Yüksek Lisans Tezi:** Dağdeviren S. Role of TNF-alpha in skeletal muscle atrophy in avariectomized rats: An experimental functional, histological and molecular biology study. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü, Haziran 2010.