



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK BÖLÜMÜ

FARELERDE RESVERATROL İLE BESLENMENİN MYOGENİN
ve mTOR DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Uzm. Dyt. Serap ANDAÇ ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

ANKARA, 2016



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK BÖLÜMÜ

FARELERDE RESVERATROL İLE BESLENMENİN MYOGENİN
ve mTOR DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Uzm. Dyt. Serap ANDAÇ ÖZTÜRK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Gül KIZILTAN

DOKTORA TEZİ

ANKARA, 2016

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı çerçevesinde Serap Andaç Öztürk tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/05/2016

Tez Konusu: "Farelerde Resveratrol İle Beslenmenin Myogenin ve Mtor Düzeyleri Üzerine Etkisi"


TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Gül KIZILTAN

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Gül Kızıltan	Başkent Üniversitesi
Doç. Dr. Mendane Saka	Başkent Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Perim Türker	Başkent Üniversitesi
Doç. Dr. Zehra Büyüktuncer Demirel	Hacettepe Üniversitesi
Doç. Dr. Makbule Gezmen Karadağ	Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı
→
PT
Mendane
M. Gezmen

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 30.. /05... / 2016 tarih ve ...055... Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Rengin ERDAL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde bana yol gösteren, sabrı ve anlayışı için hep minnettar kalacağım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Gül Kızıltan'a,

Araştırma süresince sağladığı moral ve motivasyon için sayın Doç.Dr. Mendane Saka'ya,

Araştırma boyunca desteklerini esirgemeyen sayın Doç Dr. Erkan Yurtçu'ya, sayın Vet. Dr. Didem Bacanlı'ya, sayın Öğr. Gör. Yeşim Korkmaz'a, sayın Uzm. Dyt. Beril Yılmaz'a, sayın Doç. Dr. Mutlu Demiray' a, sayın Doç. Dr. Kübra Elçiöğlü' na, sayın Uzm. Dr. İrem Öner Özkara' ya, sayın Uzm. Dr. Zeliha Arslan Ulukan' a ve

Her konuda en büyük destekçim olan eşim Ertuğrul Öztürk ve canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Serap ANDAÇ ÖZTÜRK, Farelerde resveratrol ile beslenmenin myogenin ve mTOR düzeyleri üzerine etkisi. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Programı, Doktora Tezi, 2016.

Resveratrol polifenolik bir bileşiktir. Anti-karsinojenik, anti-inflamatuvar, nöroprotektif, anti-aterojenik, anti-trombojenik özelliklerinin yanı sıra, egzersizin etkilerini taklit ettiği, mitokondri sayısı ve fonksiyonlarını arttırdığı, adipositeyi azalttığı, egzersiz tolerasyonunu iyileştirdiği belirtilmektedir. Bu çalışmada farelerde resveratrol uygulamasının, myogenin ve mTOR düzeyleri üzerine olan etkisi ve mevcut doz uygulamasının kas kütesine olası etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Çalışma, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde yürütülmüş olup; çalışmada 14 adet, swiss albino genç erişkin fare kullanılmıştır. Fareler rastgele, çalışma grubu (n:7) ve kontrol grubu (n:7) olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır. Çalışma grubuna ardışık 7 gün boyunca 20 mg/kg transresveratrol intraperitoneal yol ile verilmiştir. Yedinci gün uygulamasından sonra genel anestezi altında farelerin gastroknemius kasları çıkartılmış, ağırlıkları kaydedilmiş ve mTOR, myogenin analizleri için -80° C' de saklanmıştır. Myogenin ve mTOR düzeylerinin saptanmasında Eliza yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, çalışma grubunun 7. gün ağırlık ortalaması (22.11±3.22 g), kontrol grubundan (28.63±3.80 g) istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur (p<0.05). Sağ gastroknemius kas ağırlığı açısından değerlendirildiğinde, çalışma grubunun ortalama kas ağırlığı 0.09±0.03 g , kontrol grubunda ise 0.12±0.02 g olarak saptanmış ve aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur (p<0.05). Gruplar arasında mTOR ve myogenin düzeylerinin ortalamaları açısından istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05). Bu doğrultuda, çalışmada obezite modeli olmaksızın resveratrolün zayıflatıcı etkisinin saptanmış olması önemli olmakla birlikte, resveratrol uygulamasının kas atrofisine karşı herhangi bir koruyucu etkisi saptanmamıştır. Ayrıca atrofi sürecinde azalması beklenen mTOR düzeylerinde de değişiklik saptanmamıştır. Resveratrolün kas dokusu üzerine etkileri nispeten az

alışılmış bir konu olup, bu etkilerin saptanabilmesi için doz, süre ve kas kütlesindeki metabolik yolaklara olan etkisini araştıran daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: resveratrol, gastroknemius, ağırlık, mTOR, myogenin

Bu tez alışması, Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından 11/05/2015 tarih, 15/23 sayılı kararla uygun bulunmuştur.

ABSTRACT

Serap ANDAÇ ÖZTÜRK, The effect of feeding with resveratrol on the myogenin and mTOR levels, in mice. Başkent University, Faculty of Health Sciences, Nutrition and Dietetics Program, PhD Thesis, 2016.

Resveratrol is a polyphenolic compound. Besides having anti-carcinogenic, anti-inflammatory, neuroprotective, anti-atherogenic, anti-thrombogenic effects it also stated to mimick the effects of exercise, increase the mitochondrial number and function, decrease the adiposity and restore the exercise tolerance. In this study, it is aimed to research the effects of resveratrol intervention on the myogenin and mTOR levels and the effect of the present dose usage on the muscle mass of mice. The study has been carried out at the Başkent University Experimental Animal Research Center; 14 young adult Swiss Albino mouse were randomly divided into two groups. Experimental group (n:7) and control group (n:7). The experimental group received 20 mg/kg/day resveratrol for 7 consecutive days through intraperitoneal way. At the end of the 7th day, the gastrocnemius muscles were removed under general anesthesia, their weights were recorded and they are stored at -80°C for mTOR and myogenin analysis. To determin the myogenin and mTOR levels Elisa method was used. The average weight of the experimental group was (22.11±3.22 g) statistically lower than the average weight of the control group (28.63±3.80 g) (p<0.05). If evaluated in terms of the right gastrocnemius muscle weight, the experimental groups' average weight was found 0.09±0.03 g, whereas the control groups' weight was found 0.12±0.02 g and the difference was statistically significantly low (p<0.05). No statistical difference was found between the groups, in terms of mTOR and myogenin average levels (p>0.05). According to the results of this study it is find out that resveratrol has weight reducing effects without having an obesity model, resveratrol intervention has no protective effect against muscle atrophy. Furthermore, there were no changes in the mTOR levels which were expected to decrease during atrophy. Resveratrol effects on muscle tissue is a relatively

little-studied subject, to detect these effects more studies are needed to investigate the effective dose, time and metabolic pathways on muscle mass.

Keywords: resveratrol, gastrocnemius, weight, mTOR, myogenin

This project is approved by Başkent University Medicine and Health Sciences Research Commission (Date: 11/05/2015, Number: 15/23).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	<i>iii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iv</i>
ÖZET	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vii</i>
İÇİNDEKİLER	<i>ix</i>
SİMGELER VE KISALTMALAR	<i>xi</i>
ŞEKİLLER	<i>xiv</i>
GRAFİK VE RESİMLER	<i>xv</i>
TABLolar	<i>xvi</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Resveratrol.....	3
2.2. Resveratrol ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	5
2.2.1. Resveratrol ve karaciğer yağlanması	5
2.2.2. Resveratrol ve kanser.....	6
2.2.3. Resveratrol ve obezite	7
2.2.4. Resveratrol ve mitokondri biyogenezi.....	9
2.2.5. Resveratrol ve performans	10
2.3. Kas Dokusu	11
2.3.1. Kas hücresi.....	12
2.3.2. Kas proteinleri.....	13
2.3.3. Kas dokusu çeşitleri	15
2.3.4. Kas lifleri tipleri.....	15
2.4. Kas Atrofisi	17
2.4.1. Ubiquitin proteazom yolağı (MAFbx/MuRF1) ve kas atrofisi.....	17
2.4.2. IGF-1/PI3K/Akt/mTOR ve kas atrofisi.....	18
2.4.3. Myostatin ve kas atrofisi.....	19
2.4.4. Oksidatif stres.....	19
2.4.5. Sitokinler	20
2.5. Resveratrol ve Kas Atrofisi	20

2.6. Kas Hipertrofisi	20
2.6.1. IGF1/PI3K/Akt/ mTOR yolağı.....	21
2.6.2. Kalsinörin yolağı;	24
2.7. Miyogenez ve Miyojenik Faktörler.....	24
2.7.1. Miyogenez, miyojenik faktörler ve resveratrol	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Araştırma Yeri ve Zamanı	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Gruplandırma ve müdahale prosedürü	31
3.2.2. Kas ağırlıklarının tayini.....	32
3.2.3. Protein izolasyonu	33
3.2.4. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	34
3.2.5. mTOR Eliza analizi.....	35
3.2.6. Myogenin Eliza analizi.....	37
3.3. İstatistiksel Analizler.....	39
4. BULGULAR	40
4.1. Grupların Ağırlık Değişimi	40
4.2. Sağ Gastrokneius Kas Ağırlıkları.....	42
4.3. mTOR ve Myogenin Düzeyleri.....	44
5. TARTIşMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
6.1. Sonuçlar	56
6.2. Öneriler	57
7. KAYNAKLAR	58
8. EKLER.....	67
Ek 1 : Etik Kurul Onayı	67
Ek 2: Kimyasal Maddeler	69
Ek 3: Cihazlar.....	70

SİMGELER ve KISALTMALAR

4E-BP1	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E bağlayıcı protein 1
µL	Mikro litre
ACC	Asetil CoA karboksilaz
Akt	Protein kinaz B
AMPK	Adenosin monofosfat aktive protein kinaz
Ang-II	Anjiotensin II
aP2	Yağ asit bağlayıcı protein
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B hücre lenfoma/lösemi- 2
BSA	Bovine serum albumin
C/EBPα	CCAAT-arttırıcı- bağlayıcı protein
CnA	Kalsinörin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDL	Ekstensor digitorum longus
FABP4	Yağ asit bağlayıcı protein 4
FAS	Yağ asit sentaz
FOXO	Forkhead box O
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz 3 beta
g	Gram
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IFN_γ	İnterferon gama
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktör- 1
IGF-1R	IGF-1 spesifik tirozin kinaz reseptör
IL-1β	İnterlökin 1 beta
IL-6	İnterlökin -6
IRS1	İnsülin reseptör substrat 1

L	Litre
LPL	Lipoprotein lipaz
MAFbx	Atrogin- 1/ Kas atrofi F- β ox
MEF-2	Miyosit arttırıcı faktör 2
mg	Miligram
MHC	Miyozin ağır zincir
MHCd	Gelişimsel miyozin ağır zincir
MPC	Kas prekürsör hücreler
MRF	Miyojenik regülatör faktörler
MRF4	Kas regülatör faktör 4
mRNA	Messenger ribonükleik asit
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuRF1	Muscle ring finger 1
myoD	Miyoblast belirleyici protein
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAFLD	Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı
NFAT	Aktive T hücresi nükleer faktörü
NF-κB	Nükleer faktör kappa beta
Ng	Nanogram
NOX	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat- oksidaz
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima fatty
PBS	Fosfat tampon solüsyon
PGC-1α	Peroksizom proliferatör aktive reseptör gama koaktivatör 1- alfa
PI3K	Fosfotidilinositol 3 kinaz
PIP3	Fosfotidilinositol 3,4,5 tri fosfat
PPAR-γ	Peroksizom proliferatör aktive reseptör gama
RNA	Ribonükleik asit

ROS	Reaktif oksijen türleri
SGBS	Simpson-Galabi- Behmel-Sendrom
SIRT1	Sirtuin 1
SMAD 3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
SOL	Soleus kası
SREBP-1C	Sterol regülatory element bağlayıcı protein -1C
T1DM	Tip 1 diyabetes mellitus
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü beta
TNF-α	Tümör nekrozitan faktör alfa
TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 Resveratrolün izomerleri.....	4
Şekil 2.2 Kalp, iskelet kası ve damar yollarında egzersiz ve resveratrol tarafından düzenlenen metabolik yollar	10
Şekil 2.3 Protein sentezi ve degradasyon yolları.....	22
Şekil 2.4 mTOR- IGF-II ekspresyonu.....	23
Şekil 2.5 Miyogenez basamaklarını düzenleyen transkripsiyonel faktörler ve kinazlar	25
Şekil 2.6 Miyojenik süreç boyunca transkripsiyonel faktörler	27

GRAFİKLER

Grafik 4.1 Grupların ortalama ağırlık değişim grafiği	41
Grafik 4.2 Gruplar arasındaki ağırlık değişimi	42
Grafik 4.3 Grupların kas ağırlığı ortalamalarının karşılaştırılması	43
Grafik 4.4 mTOR ve myogenin ortalamalarının karşılaştırılması	46

RESİMLER

Resim 3.1 Genel anestezi altında gastroknemius kaslarının çıkartılması	32
Resim 3.2 Protein izolasyonu birinci aşama	33
Resim 3.3 Protein izolasyonu ikinci aşama.....	34
Resim 3.4 Eliza yıkama sonrası görünüm.....	36
Resim 3.5 Spektrofotometri işlemi sonrası görünüm.....	36
Resim 3.6 Reajan A ilave işlemi	38
Resim 3.7 Stop solüsyonu ilave işlemi sonrası görünüm.....	38

TABLolar

Tablo 2.1 Kasın yapısal elemanlarının küçükten büyüğe doğru sıralanması.....	13
Tablo 2.2 Kas proteinleri ve fonksiyonları	14
Tablo 4.1 Çalışma ve kontrol grubu 1. gün ve 7. gün ağırlıkları	40
Tablo 4.2 Grupların 1. gün ve 7. gün ağırlıkları	41
Tablo 4.3 Grupların sağ gastroknemius kas ağırlıkları	42
Tablo 4.4 Grupların sağ gastroknemius kas ağırlıklarının ortalamaları.....	43
Tablo 4.5. Grupların mTOR düzeyleri.....	44
Tablo 4.6 Grupların myogenin düzeyleri.....	45
Tablo 4.7 Grupların mTOR ve myogenin düzeyleri açısından değerlendirilmesi	45
Tablo 4.8 Çalışma grubunda mTOR ve myogenin düzeyleri ile son ağırlık ve kas ağırlığı ilişkisi	46
Tablo 4.9 Kontrol grubunda mTOR ve myogenin düzeyleri ile son ağırlık ve kas ağırlığı ilişkisi	47

1. GİRİŞ

Resveratrol son yıllarda sağlık üzerine olan birçok olumlu etkileri sonucunda ilgi uyandıran bir polifenolik bileşiktir. Anti-karsinojenik, anti-inflamatuvar, nöroprotektif, anti-aterojenik, anti-trombojenik özelliklerinin yanı sıra, insülin duyarlılığını arttırdığı ve yaşam süresini uzatabileceği bildirilmiştir. Son dönemlerde ise, resveratrolün enerji metabolizmasını düzenlemeye yardımcı olabileceği, egzersizin etkilerini taklit edebileceği, mitokondri sayısı ve fonksiyonlarını arttırabileceği, adipoziteyi azaltabileceği, egzersiz tolerasyonunu iyileştirebileceği bildirilmektedir (1). Resveratrol ilk olarak 1940 yılında *veratrum grandiflorum* O.Loos bitkisinin kökünden elde edilmiş olup (2), yetmişten fazla bitki çeşidinde mekanik yaralanma, mikrobiyal enfeksiyon, ultraviole (UV) iritasyonu gibi çevresel ya da biyolojik strese yanıt olarak üretilen (3,4) fitoaleksinin özelliği gösteren stilben grubuna ait bir bileşiktir. “Phytoalexin”, Yunanca bir terim olup phyton; bitki, alexein ise koruyucu anlamındadır. Asma, dut, yaban mersini, yer fıstığı, antep fıstığı, resveratrol üreten bitkilerden bazılarıdır (5). Resveratrol doğada iki formda bulunmaktadır; trans-resveratrol ve cis-resveratrol. Tüm izomerler biyolojik olarak aktif olmasına rağmen, çoğunlukla resveratrolün biyolojik fonksiyonları daha stabil formu olan trans-resveratrole dayandırılmaktadır (3).

Resveratrol çok sayıda reseptör, kinaz ve diğer enzimlerle de etkileşim içindedir, bu da resveratrolün biyolojik etkilerindeki temel mekanizmayı oluşturur. *İn vivo* çalışmalarda, resveratrol ile müdahalenin, dokularda metabolik düzenlemelerde etkili olan sirtuin 1 (SIRT1) ve adenosin monofosfat aktive protein kinaz (AMPK) aktivasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (6,7). Resveratrol uzman paneli, 2010’ da popülasyonun bir kısmının günde en az 1-2 mg resveratrolü diyetlerinde aldığını ve bu miktarın kronik tüketim için güvenli olduğunu belirtmiştir (2).

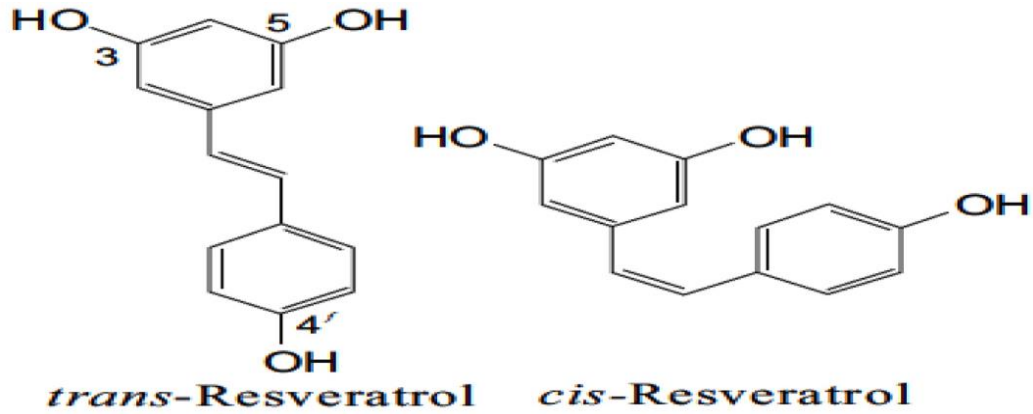
İskelet kas kütleindeki kayıplar birçok hastalık ile ilişkilidir (8). Resveratrolün protein degradasyonunu azalttığı *in vitro* çalışmalarda (9,10) gösterilmiş olsa da, *in vivo* çalışmalarda bu etkinin oluşup oluşmadığı bir tartışma konusudur. Resveratrolün, *in vitro* çalışmalarda kas hipertrofisindeki başlıca yollardan biri olan Akt (protein kinaz B) yolağını (11,12) ve miyojenik faktörleri stimüle ederek miyogenezini uyardığı gösterilmiştir (12). Ancak resveratrolün *in vivo*

olarak miyojenik faktörler üzerine etkisi çok fazla çalışılmamıştır. Bu çalışmada, *in vitro* çalışmalarda gösterilmiş olan resveratrolün miyojenik transkripsiyonel faktörler üzerindeki bu uyarıcı etkisinin *in vivo* çalışma modelinde gösterilmesi ve resveratrol uygulamasının miyojenik transkripsiyonel faktörlerden geç basamaktaki anahtar faktör olan, myogenin transkripsiyonel faktörü ve miyogenez için önemli bir kinaz olan mTOR düzeyleri üzerine etkisi olup olmadığının, buna bağlı olarak mevcut dozdaki resveratrol uygulamasının kas kütlesine olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Resveratrol

Resveratrol özellikle 1997’ den bu yana sağlık üzerine olan birçok olumlu etkileri sonucunda ilgi uyandıran bir polifenolik bileşiktir. Anti-karsinojenik, anti-inflamatuvar, nöroprotektif, anti-aterojenik, anti-trombojenik özelliklerinin yanı sıra, insülin duyarlılığını arttırdığı ve yaşam süresini uzatabileceği bildirilmiştir. Son dönemlerde ise, resveratrolün enerji metabolizmasını düzenlemeye yardımcı olabileceği, egzersizin etkilerini taklit edebileceği, mitokondri sayısı ve fonksiyonlarını arttırabileceği, adipoziteyi azaltabileceği, egzersiz tolerasyonunu iyileştirebileceği bildirilmektedir (1). Resveratrol ilk olarak 1940 yılında veratrum grandiflorum O.Loes bitkisinin kökünden elde edilmiş olup (2), yetmişten fazla bitki çeşidinde mekanik yaralanma, mikrobiyal enfeksiyon, ultraviyole (UV) iritasyonu gibi çevresel ya da biyolojik strese yanıt olarak üretilen (3,4) fitoaleksinin özelliği gösteren stilben grubuna ait bir bileşiktir. “Phytoalexin”, Yunanca bir terim olup phyton; bitki, alexein ise koruyucu anlamındadır. Asma, dut, yaban mersini, yer fıstığı, antep fıstığı, resveratrol üreten bitkilerden bazılarıdır. Resveratrol özellikle renkli üzüm çeşitlerinin kabuklarında yüksek miktarda sentezlenmektedir (0.30-14.10 mg/g yaş ağırlık; 9.30-78.50 mg/g kuru ağırlık) (5). Karadut, üzüm ve kırmızı şarabın içinde de bulunmakta olan resveratrolün “Fransız paradoksunda” da payı olduğu öne sürülmektedir (*Fransız paradoksu*; Fransızların kırmızı şarap tüketimine bağlı olarak kardiovasküler hastalıklara karşı epidemiyolojik olarak daha düşük insidanslarının olmasıdır) (13). Resveratrol doğada iki formda bulunmaktadır; trans-resveratrol ve cis-resveratrol (14) (Şekil 2.1). Tüm izomerlerin biyolojik olarak aktif olmasına rağmen, çoğunlukla resveratrolün biyolojik fonksiyonları daha stabil formu olan trans-resveratrole dayandırılmaktadır (3). Resveratrol ısıya dayanıklı olması nedeni ile birçok yiyecek çeşidinde aktif formunu (trans-resveratrol) koruyabilmekte, ağız yoluyla alındıktan sonra hemen sindirilmekte ve hızla kana karışmaktadır (5).



Şekil 2.1 Resveratrolün izomerleri

Resveratrolün kandaki maksimum konsantrasyonunda doza bağımlı yanıt görülmektedir (6). Farmakokinetik olarak düşük doz uygulaması sonrasında kandaki pik resveratrol düzeyine 30 dakika, yüksek doz uygulamaları sonrasında ise pik konsantrasyona 1.5-2 saat içinde ulaşıldığı gösterilmiştir ise de, son dönemde resveratrolün hızlı absorbe edildiği ve doz ne olursa olsun pik kan konsantrasyonuna 1 saat sonrasında ulaşıldığı raporlanmıştır (15). Brown ve arkadaşlarının (16) yaptığı çalışmada, 29 gün boyunca 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 g/gün/resveratrol deneklere verilmiştir. Müdahale ve sonrasındaki 2 haftalık süreçte hematolojik, biyokimyasal ve klinik incelemeler yapılmış ve ciddi bir yan etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Çalışmada en sık görülen yan etki gastrointestinal yakınma (karın ağrısı, bulantı ve diyare gibi) olarak saptanmış ve 1 g/gün' den fazla doz resveratrol alanlarda bildirilmiştir. Tipik olarak gastrointestinal semptomların başlaması kapsülün alımından 1 saat sonra başlamış ve gün boyunca devam etmiştir. Çalışma sonucunda; resveratrol dozunun 1 g/gün' ü aşmaması önerilmiştir. Benzer şekilde planlanmış başka bir çalışmada da, 4 haftalık süreç boyunca günlük 1 gram resveratrol alımının genel olarak iyi tolere edildiği ve resveratrolün ilaç metabolizması ve enzim aktivitelerinde yaratabileceği etkiler nedeniyle bu dozun aşılması gerekliliği vurgulanmıştır (17). Resveratrol uzman paneli 2010' da popülasyonun bir kısmının günde en az 1-2 mg resveratrolü diyetlerinde aldığını ve bu miktarın kronik tüketim için güvenli olduğunu belirtmiştir (2).

Resveratrolün sağlık üzerine olan etkileri çoklu mekanizmalar üzerinden yürümektedir. Resveratrol çok sayıda reseptör, kinaz ve diğer enzimlerle de etkileşim

içindedir, bu da resveratrolün biyolojik etkilerindeki temel mekanizmayı oluşturur. İn vivo çalışmalarda, resveratrol ile müdahalenin sirtuin 1 (SIRT1) ve adenosin monofosfat aktive protein kinaz (AMPK) (bu bileşikler dokudaki metabolik düzenlemeleri etkilemektedir) aktivasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (6,7).

2.2. Resveratrol ve Sağlık Üzerine Etkileri

2.2.1. Resveratrol ve karaciğer yağlanması

Dünyada obezite prevalansındaki artışa bağlı olarak alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığında da (NAFLD) artış görülmektedir (18). İnsülin direnci, oksidatif stres ve inflamatuvar süreçler, NAFLD progresyonunda ve patogenezinde bütüncül rol oynamaktadırlar, bu nedenle çoklu vuruş (multihit) ya da eski adıyla çift vuruş (double hit) hipotezi NAFLD patogenezini tanımlamak için kullanılır. İlk vuruşun sonucu olarak insülin direnci ortaya çıkmakta ve kanda artan yağ asidi düzeyi karaciğere giriş yaparak hepatosteatoza neden olmaktadır. İkinci vuruş, hepaotosteatoza bağlı gelişen inflamasyonun sonucu olarak gelişir (19). Tedavi seçenekleri olarak ağırlık kaybı, E vitamini ve Glitazon tedavileri ön planda olmakla birlikte kısıtlılıkları ve uzun vadedeki yan etkileri nedeniyle, hastalığın tedavisinde alternatif tedavi modelleri aranmaktadır (18). AMPK ve SIRT1, hepatik lipit metabolizmasını düzenleyen 2 kritik moleküldür. AMPK; lipit metabolizmasında yağ asit oksidasyon yolağında, lipit sentezini inhibe ederek ve oksidasyonu arttırarak kritik yol oynar (20). Resveratrol, AMPK fosforilasyonunu arttırarak, lipojenik genlerin [Sterol regülatör element-bağlayıcı protein 1C (SERBP-1C) ve yağ asidi sentataz (FAS)] baskılanmasına neden olmaktadır (21). SIRT1 aktivasyonu, NAFLD patogenezinde önemli olan mekanizmalarda inhibisyona neden olmaktadır (19). Resveratrol güçlü bir SIRT1 agonisti olarak tanımlanmış olup, SIRT1 proteininin ekspresyonunu ve aktivasyonunu güçlü bir şekilde stimüle etmektedir (20). Resveratrolün NAFLD' deki bozulmuş lipit metabolizması üzerine etkisinin sirtuin yolağı ve hepatik düşük dansiteli lipoprotein reseptörlerinin up-regülasyonu üzerinden olduğu düşünülmektedir (21). Resveratrol müdahalesinin SIRT1-AMPK sinyalizasyonu arttırarak lipit akümüülasyonunu azalttığı belirtilmiştir (20). Resveratrolün, NAFLD ve inflamatuvar biyogöstergelerin ekspresyonuna etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada; resveratrolün vücut yağını, total kolesterol, trigliserit, transaminaz ve plazma insülin düzeylerini azalttığı, bununla birlikte karaciğerde inflamatuvar göstergeler olan, tümör nekroz faktör alfa

(TNF- α), interlökin- 6 (IL-6) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) mRNA ekspresyonlarında da anlamlı azalma sağladığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda resveratrol ile müdahalenin lipit metabolizmasını iyileştirdiği, NAFLD' yi azalttığı ve karaciğerdeki proinflamatuvar göstergeleri azalttığı vurgulanmıştır (22).

Bujanda ve arkadaşlarının (23) yaptığı çalışmada da, resveratrolün NAFLD' nin şiddetini azalttığı ve bu etkinin TNF- α ve anti-oksidant aktivite aracılığı ile yaptığı vurgulanmıştır. Resveratrolün NAFLD üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda resveratrol uygulamasının, yüksek yağlı beslenmenin indüklediği insülin direncini ve yağlı karaciğeri AMPK' yı aktive ederek (24), karaciğere trigliserit akümülyasyonunu azaltarak (25) ve enerji metabolizmasını düzenleyen yolları up-regüle ederek yüksek enerjili diyetin indüklediği steatoz ve insülin direncini önlediği gösterilmiştir (26). Resveratrolün sadece NAFLD' de değil, alkole bağlı yağlı karaciğer hastalıklarında da SIRT1 ve AMPK yolları üzerinden etkili olduğu belirtilmektedir (20). Ancak tüm bu hayvan modelleri ile çelişkili olarak NAFLD tanısı almış obez ve kilolu bireyler üzerinde resveratrolün etkinliğinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise resveratrol alan grupta insülin direnci, steatozis, abdominal yağ dağılımlarında, plazma lipit ya da anti-oksidan düzeylerinde başlangıca göre herhangi bir azalma saptanmazken, karaciğer enzimlerinde de artış gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda, resveratrolün NAFLD özelliklerinde herhangi bir iyileşme sağlayamadığı, aksine karaciğer enzimlerinde artışa neden olduğu için daha çok çalışmanın gerekliliğine işaret edilmiştir (27).

2.2.2. Resveratrol ve kanser

Kanser, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde başlıca ölüm nedenlerinden birisidir (28). İnvitro ve hayvan çalışmalarında değişik fitokimyasalların anti-proliferatif, pro-apoptotik, anti-metastatik ve anti-anjiyogenik etkileri gösterilmiş olmasına rağmen, klinik etkinlikleri hakkında kısıtlı sayıda çalışma vardır (29-31). Resveratrolün sağlık üzerine etkileri pek çok alanda gösterilmiş olup anti-kanser özelliği de literatürde oldukça çok çalışılmış bir alandır. Resveratrolün karsinogenez ile ilgili birçok hücrel olayda düzenleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (32). Resveratrolün direkt olarak deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asite (RNA) bağlanarak, anti-oksidan enzimleri aktive ettiğini, inflamasyonu önlediğini ve malign hücrelere özgü olarak genetik bütünlüğü sağlayan DNA hasarını kontrol eden kinazları

stimüle ettiği öne sürülmektedir (33). Resveratrolün hücre farklılaşması ve apoptozis gibi birçok kompleks hücrenel etkisi vardır ancak resveratrolün anti-tümör etkisi tam olarak anlaşılammıştır. Bununla birlikte temel olarak bu etkideki başlıca mekanizmanın apoptozis üzerinden yürüdüğü bildirilmektedir (34). Resveratrolün anti-kanser etkisinin 3 temel mekanizma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlar;

a) Karsinojenik aktivitenin inhibisyonu ve karsinojen detoksifikasyonunun indüklenmesi,

b) Büyümenin durdurulması ve apoptozis,

c) Kanserle ilişkili proinflamatuvar sinyalizasyon yollarının baskılanmasıdır (81,35).

Resveratrolün prostat, meme (36), kolorektal kanser (28,37), fibrosarkom (38), karaciğer, deri ve akciğer kanserinde kanser önleyici ve kemotöropatik etkisi bildirilmiştir (32). İsviçre’ de yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre diyetin lignan, kuarsetin ve resveratrolde zengin olmasının özofajial kanser gelişimine karşı koruyucu etken olabileceği gösterilmiştir (39). Resveratrolün sadece anti-kanser özelliği ile ilişkili olarak değil, kemotöropatik ilaçların sitotoksik etkilerinin artırılması ve sistemik yan etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmaları da mevcuttur; bu çalışmalardan Yuan ve arkadaşlarının (32) yaptığı çalışmada resveratrolün kolorektal kanserli hücrelerde sisplatinin sitotoksik etkisini arttırdığı belirtilmiştir.

2.2.3. Resveratrol ve obezite

Obezite; Amerika Birleşik Devletlerinde tek başına yılda 300.000’ e yakın ölümden sorumlu tutulmaktadır. Obezitenin gelişmesinde temel neden enerji yoğunluğu yüksek besinler olarak gösterilmektedir. Obezitenin önlenmesinde ise, enerji alımının kısıtlanması temel yaklaşım olarak belirtilmektedir (40). Enerji alımının kısıtlanmasının tip 2 diyabet, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığa karşı koruyucu etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Son dönemlerde ise, enerji alımının azaltılması ile sağlanan bu faydalı etkileri taklit edebilecek ve obezite tedavisinde kullanılacak doğal ya da sentetik bileşiklerin tanımlanmasına odaklanılmıştır (41). Resveratrolün anti-obezite mekanizması tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte, adipogenez, apoptozis, lipogenez, lipolizis, termogenez ve yağ asit oksidasyonu gibi çeşitli metabolik yollara olan etkisi

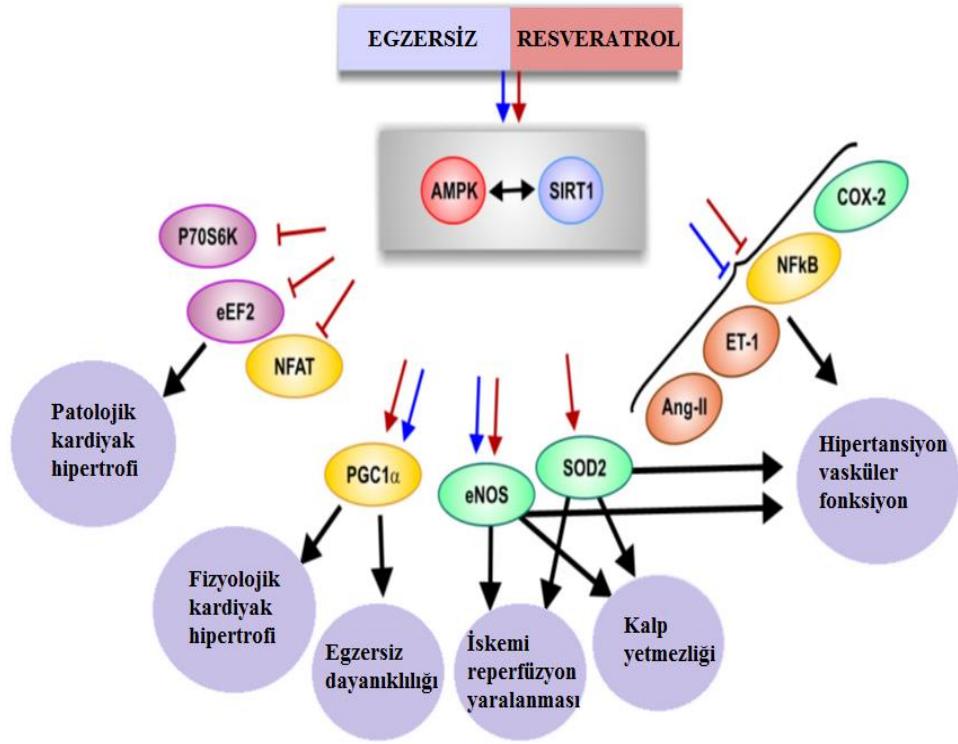
üzerinde durulmaktadır (42). Yapılan bir çalışmada, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) ratların diyetlerine resveratrol ilave ederek anti-obezite etkileri araştırılmıştır (OLETF ratlarda hiperplazi görülür ve normal diyetle bile obez hale gelmektedirler). Bu ratlarda diyetlerine eklenen resveratrol ile 4 haftalık uygulama sonrası yağ metabolizmalarında anlamlı azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir (40). Obez hayvanlarda resveratrolün beyaz yağ dokusundaki anti-adipojenik ve anti-inflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerle kıyaslandığında, % 0.4 resveratrol içeren diyet alan farelerde ağırlık kazanımı anlamlı (-%48) azalmıştır. Çalışma sonuçlarında resveratrolün visceral adipogenezini engellediği belirtilmiştir (43). Resveratrolün preadipozit farklılaşmasını engelleyerek (44), adipozit proliferasyonunu azaltarak (45), adipozit apoptosizini indükleyerek (45), lipogenezini azaltarak (46), lipolizi ve yağ asitlerinin β -oksidasyonunu teşvik ederek obeziteyi engelleyici bir potansiyelinin olduğu gösterilmiştir (47). Resveratrolün tüm bu etkilerinin adipogenez, lipogenez ve yağ asitlerinin β -oksidasyonunun temel regülatörü olan AMPK, sirtuin 1 (SIRT1) ve peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama koaktivatör 1-alfa (PGC-1 α) ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (48). 2003 yılında resveratrolün, enerji metabolizmasını ve mitokondriyal homeostazı düzenleyen önemli bir molekül olan sirtuin 1 (SIRT1) aktivatörü olduğu keşfedilmiştir (49). Aktive edilmiş SIRT1, transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalar aracılığı ile PGC-1 α 'yı aktive etmektedir. Resveratrol PPAR- γ (Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama), C/EBP α (CCAAT-arttırıcı-bağlayıcı protein), ve yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4), ve diğer biyolojik göstergeler proteinlerin [FOXO1 (Forkhead box O) gibi] ekspresyonunu baskılayarak; preadipozit farklılaşmasını doza bağımlı olarak engellemektedir (48). Yapılan bir çalışmada, resveratrolün ağırlık kazanımı üzerine olan etkisini, enerji alımını azaltarak, dinlenme metabolik hızını ve yağ mobilizasyonunu arttırarak yaptığı vurgulanmıştır (50). Resveratrolün anti-obezite etkisi yağ oksidasyonu, metabolizması ya da adipojenik gen ekspresyonlarının [PPAR, C/EBP α , SREBP-1c, FAS, LPL, yağ asit bağlayıcı protein (aP2) ve leptin gibi] baskılanması ile ilişkili bulunmuştur (43). Resveratrol müdahalesinin ağırlık artışına, lipojenik enzimler, kan lipit profili ve glukoz üzerine etkisi olmadığı da raporlanmaktadır (48). Sağlıklı 24 obez erkekte, yüksek doz resveratrol uygulaması (1500 mg/gün) ile yapılan bir çalışmada resveratrolün, endojen glukoz üretiminde

herhangi bir değişiklik yaratmadığı vurgulanmıştır. Dahası dinlenme enerji harcaması ve kan basıncı da resveratrol'den etkilenmemiştir. Ektopik (karaciğer ve iskelet kası) ve viseral yağ içeriği, magnetik rezonans, spektroskopi görüntüleme kombinasyonu ile ölçülmüş ve yüksek doz resveratrol'den etkilenmediği, ayrıca resveratrolün plazma metabolizma ve inflamasyon göstergelerini etkilemediği raporlanmıştır (49). Bu çelişki çalışmalarındaki zaman, resveratrol dozu ve deney hayvanının yaşından kaynaklanıyor olabilir (48).

2.2.4. Resveratrol ve mitokondri biyogenezi

Mitokondriler çok dinamik organellerdir ve biyogenezleri endotelial hücre metabolizması, redoks düzenlemeleri, sinyal iletimi ile ilişkili görülmektedir. Mitokondriyal biyogenezdeki bozulma sıklıkla diyabet ve metabolik sendromda görülmekte ve bu hücrel enerji dengesizliği, oksidatif stres, endotelial disfonksiyon gibi patolojik durumlara katkıda bulunmaktadır (51). Mitokondriler sürekli olarak yapılıp yıkılmakta ve enerji gereksinmesindeki değişikliklere göre yoğunlukları değişmektedir. Egzersiz ya da diğer uyarılar karşısında mitokondriyal içerikte değişiklik olması mitokondriyal biyogenez olarak tanımlanmaktadır (52). Mitokondriyal biyogenez ve döngünün etkili kontrolü; enerji üretimi, endojen oksidatif stresin engellenmesi ve sağlıklı yaşlanma için elzemdir. Birçok endojen ve ekzojen faktör, PGC-1 α aracılığı ile mitokondriyal biyogenezi regüle eder. Resveratrol, PGC-1 α ' in aktivasyonunu artırır ve PGC-1 α ' in ekspresyon düzeyi mitokondriyal biyogenez ile direkt ilişkilidir (53). Bu yolağın, yaşlanma sürecini yavaşlattığı, birçok kronik hastalığı önlediği, kaslarda dayanıklılığı arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 2.2) (6,54).

Resveratrol, başta mitokondri biyogenezi ve mitokondriyal fonksiyonlardaki olumlu etkilerine bağlı olarak, kanser, yaşlanma, obezite, karaciğer yağlanması gibi birçok hastalığın önlenmesinde umut vaad etmesine rağmen, klinik çalışmaların sonuçları halen çelişkilidir ve etki mekanizmalarının anlaşılması, etkin doz aralığının belirlenebilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.2 Kalp, iskelet kası ve damar yollarında egzersiz ve resveratrol tarafından düzenlenen metabolik yollar

2.2.5. Resveratrol ve performans

Beslenme ve sportif performans arasındaki ilişki, en az 3000 yıldır insanların ilgi konusudur. Besin maddelerinin kullanılmasıyla ilgili direkt çalışmalar ise son 150 yıldır yapılmaktadır (55). Beslenmenin antrenman ve müsabaka başarısı üzerine olan etkisi yüzyıllardır bilinmektedir. Ergojenik yardımlar; egzersiz performans kapasitesini ve antrenman adaptasyonunu geliştirmek için kullanılan egzersiz tekniği, mekanik alet, beslenme uygulaması, farmakolojik metod ya da psikolojik teknikleri kapsamaktadır. Ergojenik yardım olarak diyet takviyelerinin kullanımı tüm spor dalları arasında çok yaygındır (56).

Bir fiziksel aktivite sırasında, o fiziksel aktivitenin gerektirdiği fizyolojik, biyomekanik ve psikolojik verime “performans” adı verilir (57). Performans için enerji üretimi önemli olduğundan, iskelet kas kütlelerinin ve hücrenin enerji santrali olarak bilinen mitokondrilerin sayısının önemi büyüktür. Mitokondrilerin sayıları egzersiz ya

da diğ er uyar an lar kar şı s ın da de ğ i ş e b i l m e k t e d i r v e b u m i t o k o n d r i y a l b i y o g e n e z o l a r a k t a n ı m l a n m a k t a d ı r (52). B u u y a r a n l a r d a n e g z e r s i z i n m i t o k o n d r i y a l b i y o g e n e z i %40 a r t t ı r d ı ğ ı g ö s t e r i l m i ş t i r (58). A n c a k y a p ı l a n *in vitro* ç a l ı ş m a l a r a g ö r e s a d e c e e g z e r s i z d e ğ i l , r e s v e r a t r o l ü n d e i s k e l e t k a s l a r ı v e k a r a c i ğ e r d e m i t o k o n d r i y a l f o n k s i y o n v e b i y o g e n e z i i y i l e ş t i r d i ğ i g ö s t e r i l m i ş t i r (51,59). S o n d ö n e m l e r d e r e s v e r a t r o l ü n p e r f o r m a n s v e d a y a n ı k l ı l ı k ü z e r i n e o l u m l u e t k i l e r i o l d u ğ u r a p o r e d i l m e k t e d i r . B u n a g ö r e r e s v e r a t r o l ü n ; e g z e r s i z i n y a p t ı ğ ı g i b i , i s k e l e t k a s m i t o k o n d r i y a l b i y o g e n e z i n i , y a ğ a s i d i o k s i d a s y o n u n u v e e g z e r s i z p e r f o r m a n s ı n ı a r t t ı r d ı ğ ı , y i n e r e s v e r a t r o l t a k v i y e s i n i n e g z e r s i z i n y a r a t t ı ğ ı e t k i y i g ü ç l e n d i r d i ğ i v e s o n u ç o l a r a k b u e t k i l e r i n d e n d o l a y ı e r g o j e n i k y a r d ı m c ı o l a r a k k u l l a n ı l a b i l e c e ğ i ö n e s ü r ü l m e k t e d i r (60).

Diğ er ç a l ı ş m a l a r d a i s e , r e s v e r a t r o l i l e b e s l e n m e n i n e g z e r s i z p e r f o r m a n s ı n d a a r t ı ş v e e g z e r s i z i n i n d ü k l e d i ğ i y o r g u n l u k i l e i l i ş k i l i p a r a m e t r e l e r d e (l a k t a t , a m o n y a k v e k r e a t i n k i n a z g i b i) , d o z a b a ğ ı m l ı o l a r a k a z a l m a , o k s i j e n t ü k e t i m i n d e a r t ı ş , i s k e l e t k a s ı n d a m i t o k o n d r i y a l f o n k s i y o n l a r l a i l i ş k i l i e n z i m l e r i n m R N A s e v i y e l e r i n d e a r t ı ş s a p t a n m ı ş v e b u s o n u ç l a r a d a y a n a r a k r e s v e r a t r o l ü n e g z e r s i z p e r f o r m a n s ı n ı a r t t ı r a b i l e c e k b i r a j a n o l a r a k k u l l a n ı l a b i l e c e ğ i ö n e s ü r ü l m ü ş t ü r (61,62). E g z e r s i z m o d e l i o l m a k s ı z ı n y a ş l ı f a r e l e r d e r e s v e r a t r o l k u l l a n ı m ı n ı n p e r f o r m a n s ü z e r i n e o l u m l u e t k i l e r i n i n s a p t a n m a s ı r e s v e r a t r o l ü n e g z e r s i z i l e b e n z e r y o l a k l a r ı s t i m ü l e e t t i ğ i n i d ü ş ü n d ü r m e k t e d i r (60). L a g o u g e v e a r k a d a ş l a r ı n ı n (63), y a p t ı ğ ı ç a l ı ş m a d a , r e s v e r a t r o l t a k v i y e s i i l e k a s l i f l e r i n d e g l i k o l i t i k T i p I I l i f t e n d a h a o k s i d a t i f ; T i p I l i f l e r e g e ç i ş i n i n d ü k l e d i ğ i v e b u n u n a r t m ı ş k a s d a y a n ı k l ı l ı ğ ı n a k a t k ı s a ğ l a y a b i l e c e ğ i b i l d i r i l m i ş t i r . Ç a l ı ş m a d a r e s v e r a t r o l ü n ; k a s g ü c ü n ü a r t t ı r m a s ı n a y o l a ç a n a d a p t a s y o n b e l i r l e n e m e z i k e n , ç ı z g i l i k a s k o n t r a k s i y o n u i l e i l i ş k i l i g e n l e r i n e k s p r e s y o n u n u a r t t ı r d ı ğ ı g ö s t e r i l m i ş t i r .

2.3. Kas Dokusu

Vücut kütle sinin yaklaşık % 40 kadarını kaslar oluşturmaktadır (64). Başlıca lokomotor fonksiyonlarının yanı sıra, iskelet kaslarının glikojen depolamak ve aminoasit katabolizması gibi metabolik rolleri de vardır. Kas dokusu mekanik ve metabolik görevlerinden dolayı yaralanma ve zedelenmelere açık bir dokudur. Kas dokusundaki kayıplar ya da defektler sağlık üzerine olumsuz etkiler yaratmaktadır (65).

Kaslarda önemli miktarlarda filamentöz yapıda proteinler olan aktin ve miyozin yer almaktadır. Bu proteinler kalsiyum varlığında, adenozin trifosfatı (ATP) kullanarak kas kasılmasında görev yapmaktadır (64).

2.3.1. Kas hücresi

Tek bir kas hücresine kas lifi denir. Her kas lifi gelişme sırasında miyoblastlar denen, farklılaşmamış, tek çekirdekli birkaç hücrenin çok çekirdekli silindirik bir hücre şeklinde birleşmesiyle oluşur. İskelet kasındaki bu farklılaşma doğuma yakın zamanda tamamlanır ve bu farklılaşmış lifler bebeklikten yetişkinliğe kadar boyut olarak büyümeye devam eder. Ancak doğumdan sonra miyoblastlardan yeni lifler oluşmaz. Eğer iskelet kası lifleri bir yaralanma sonucu hasar görürse, diğer kas lifleri bölünerek, hasarlanan liflerin yerini alamaz. Kas liflerine komşu yerleşmiş bulunan satellit hücreler, emrionik miyoblastlar gibi bir değişim göstererek yeni lifler oluşturabilir. Bir yeni kas lifi oluşturabilme kapasitesine rağmen, eğer kas, ağır hasar görmüş ise tam gücüne ulaşamaz. Kas dokusunun kaybında gerçekleşen onarıcı mekanizma genel olarak kalan liflerin çaplarının büyümesi (hipertrofi) ile gerçekleşir (66). Makroskobik düzeyde kaslar, iskelet kasının çizgili görüntüsünü oluşturan ve fasikül adı verilen uzun çok çekirdekli kas lifi hücreleri (miyofibril) demetlerini içermektedirler. Miyofibril demetlerini oluşturan miyofibril hücreleri, miyoflament proteinlerinden meydana gelmektedir. (Tablo 2.1) (64).

Kas lifini (hücre) çevreleyen hücre zarına sarkolemma denir. Kas hücresi ve sinir sınırı olan sarkoplazmada organik ve inorganik bileşikler bulunur. Miyofibriller iskelet kasının kasılma mekanizmasında görev alan fonksiyonel birimlerdir. Uzunlamasına incelendiklerinde, sarkomer adı verilen çok sayıda bölmelere ayrıldıkları görülür. Sarkomer kas hücresinde kasılma işini yapan en küçük birimdir. Sarkomeri, dolayısıyla miyofibrilleri oluşturan protein yapısındaki miyoflamentler, ince (aktin) ve kalın (miyozin) olmak üzere iki türdür. Sarkomeri (miyofibrili) oluşturan ince flament aktin, troponin ve tropomiyozin proteinlerinden oluşurken, kalın flament sadece miyozin molekülünden oluşur (67).

Tablo 2.1 Kasın yapısal elemanlarının küçükten büyüğe doğru sıralanması

Mikroskobik birim	Fasikül: kas hücre demeti
Hücreseel birim	Miyofibril hücresi: uzun çok çekirdekli hücre
Subsellüler birim	Miyofibril: miyoflament proteinlerden oluşur
Fonksiyonel birim	Sarkomer; kontraktıl birim, miyofibrillin tekrarlanan birimi
Miyofilament bileşenleri	Proteinler; temelde aktin ve miyozin

2.3.2. Kas proteinleri

Kas kasılması, aktin ve miyozin etkileşimi ve konformasyonlarındaki değişiklikler aracılığı ile gerçekleşmektedir. ATP molekülünün kimyasal enerjisini kasın mekanik hareketine aktomiyozin kompleksi dönüştürmektedir. Bu iki miyoflament proteini toplam kas proteininin %90 kadarını oluşturmaktadır. Diğer aktomiyozin ilişkili proteinler, kas proteinlerinin etkileşimi ve kasılmanın koordinasyonu için gereklidir (Tablo 2.2) (64).

2.3.2.1. Miyozin

Kas proteininin yarısından fazlasını miyozin oluşturmaktadır. Kalsiyum varlığında ATPaz aktivitesi bulunan ve iki globüler bölge içeren uzun bir protein şeklindeki miyozinin yapısında iki ağır ve dört hafif zincir yer almaktadır (64). Her miyozin molekülünün kuyruğu kalın filamentin ekseni boyunca uzanırken, iki globüler kafa ise çapraz köprüleri oluşturmak üzere yanlardan dışa doğru yayılır. Her globüler başta , biri aktin, diğeri de ATP için, iki bağlanma yeri vardır. ATP bağlanma bölgeleri aynı zamanda bir ATPaz enzimi olarak görev yaparlar ve ATP bağlarını hidrolize ederek kasılma için gereken enerjiyi ortaya çıkarırlar (66).

Tablo 2.2 Kas proteinleri ve fonksiyonları

Protein	Fonksiyon
Miyozin	Kalsiyuma bağımlı ATP' az aktivitesi
C- protein	Miyozinin kalın filamentlere katılımı
M- protein	Miyozin filamentlerinin M çizgisine bağlanması
Aktin	G- aktin filamentöz F- aktine polimerize olması
Tropomiyozin	F aktinin konformasyonel değişikliklerinin stabilizasyonu
Troponin C, I ve T	Aktomiyozin etkileşiminin düzenlenmesi
α - ve β - aktinin	F aktin stabilizasyonu ve Z çizgisine bağlanması (olasılıkla)
Nebulin	F aktin filamentlerinin uzunluğunun belirlenmesi
Titin	Sarkomerin, dinlenme gerilimi ve uzunluğunun kontrolü
Desmin	Kas hücrelerinde miyofibrillerin organizasyonu
Distrofin	Sitoiskelet ve kas hücre, plazma membranının güçlendirilmesi

2.3.2.2. Aktin

Aktin, globüler G aktin küçük alt birimlerinden oluşmaktadır. G aktin alt birimlerinin baş- kuyruk şeklinde polimerizasyonundan filament yapısında olan F- aktin elde edilmekte ve iki polimer zincirin birbiri etrafında sarılması ile F- aktin miyoflamenti meydana gelmektedir (64).

Bir aktin molekülü tek bir polipeptitten oluşan globüler bir proteindir. Diğer aktin molekülleri ile polimerize olarak birbiri üzerine sarmalanmış ikili bir zincir oluşturur. Bu zincirler bir ince filamentin esasını oluştururlar. Her aktin molekülünde miyozin için bir bağlanma yeri bulunur (66).

2.3.2.3. Tropomiyozin ve troponinler

Tropomiyozin, F-aktin olukları boyunca ilerleyen fibröz bir proteindir. Yaklaşık yedi G- aktin birimi ile temasta olan her tropomiyozin molekülü F- aktinin stabilizasyonunda ve kasılmasında aktin alt birimleri arasındaki konformasyonel değişikliklerin koordinasyonunda rol oynamaktadır. Kalsiyum eksikliğinde tropomiyozin, aktin üzerindeki miyozin bağlanma bölgesini bloke etmektedir. Tn-

T(tropomiyozin bağlayıcı), Tn-C (Kalsiyum bağlayıcı) ve Tr-I (inhibitör alt birim) proteinlerinden oluşan bir troponin proteinler kompleksi, tropomiyozine bağlıdır. Troponinler aktin ve miyozin arasındaki etkileşimi düzenlemektedirler (64). Kas hücreesindeki miyofibriller ve dolayısıyla sarkomerde miyoflamentlerin yerleşim düzeni, iskelet kas hücrelerine çizgili görünüm verirler. Sarkomerin her iki ucunda aktin flamantlerinin oluşturduğu bölgeye “I bandı” adı verilir ve açık renkli görülür. “A bandı” ise aktin ve miyozin flamantlerince oluşturulur, koyu renklidir. A bandının ortasında ise yalnızca miyozin flamentinden oluşan “H bandı” yer alır. Aktin flamentlerinin oluşturduğu I bandının arasında ise “Z çizgileri” bulunur ve iki Z çizgisi arasındaki bölgeye “sarkomer” adı verilir ve sırasıyla I;A; I bantlarından oluşur (67).

2.3.3. Kas dokusu çeşitleri

Organizmada 3 tür kas dokusu vardır. Bunlar sırasıyla şu şekildedir;

Düz kaslar; otonom sinir sistemi tarafından uyarılan ve istem dışı kasılan düz kaslar, aktin ve miyozin flamentlerinin, belirli bir düzen içinde değil de rastgele bir dağılım göstermesi nedeniyle, mikroskopik açıdan enine çizgi göstermezler ve bu yüzden düz kaslar adını alırlar. Sinirsel kontrolü nedeniyle de istem dışı kasılan kaslar olarak nitelendirilirler. Kan damarları, iç organlar, barsak vb. organlarda bulunurlar (67).

Çizgili (iskelet) kaslar: aktin ve miyozin flamentlerinin belirli bir düzen içinde dağıldığı iskelet kasları, çizgili görünümündedir ve istemli kaslar olarak nitelendirilirler. Somatik sinir sistemi tarafından uyarılan iskelet kaslarının kasılması ile hareket meydana gelir (66,67).

Kalp kası; yapısal açıdan iskelet kaslarına benzeyen kalp kası (miyokard) çizgili görünür. Fonksiyonel açıdan ise düz kaslara benzer (istem dışı), otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilir (67).

2.3.4. Kas lifleri tipleri

İskelet kas liflerinin mekanik ve metabolik karakteristikleri birbirinden farklılık gösterir. Farklı tiplerdeki kas lifleri

- (1) Maksimal kasılma hızına göre – yavaş ya da hızlı-
- (2) ATP yapımında kullandıkları esas yola göre – oksidatif ya da glikolitik özellikleri esas alınarak sınıflandırılmaktadır (66,67).

Yavaş ve hızlı kas liflerindeki miyozinlerin ATP'yi maksimal parçalayabilme hızları birbirlerinden farklıdır. Bu özelliği nedeniyle çapraz köprü döngüsünün ulaşabildiği maksimal hız, maksimal kasılma hızının da belirleyicisidir. Miyozin ATPaz aktivitesi yüksek olan ve “hızlı lifler” olarak adlandırılan kas lifleri, aynı zamanda “TIP II lifler” olarak da sınıflandırılmaktadır. Hızlı liflerin bazı alt grupları ise, aralarındaki küçük yapısal farklılıklar ile birbirlerinden ayırt edilebilir. Öte yandan miyozin ATPaz aktivitesi yavaş olan kas liflerine “yavaş lifler” veya “TIP I kas lifleri” adı verilir. Hızlı liflerin çapraz köprü dönüşüm hızı yavaş liflerden dört kat daha hızlı olmakla beraber, çapraz köprüler tarafında oluşturulan kuvvet her iki kas lifinde de yaklaşık olarak birbirine eşittir (66).

İskelet kaslarının sınıflandırılmasında başvurulan ikinci yaklaşım ATP sentezinde kullanılan enzimatik sürecin tipidir. Yapısında çok sayıda mitokondri bulduran bazı liflerin oksidatif kapasitesi de yüksektir. Bunlar “oksidatif lifler” olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca bu tür kasların oksijen bağlayıcı protein olarak bilinen miyogloblin içeriğinden zengin olması, kas lifleri arasında oksijen difüzyon hızını artırırken, az miktarda oksijen depo edilmesine de olanak sağlar. Oksidatif liflerin yapısında bulunan yüksek miktardaki miyogloblin kas hücresine koyu kırmızı rengi verdiği için, oksidatif liflere aynı zamanda “kırmızı kas lifleri” adı da verilmektedir (66).

Öte yandan “glikolitik lifler” az sayıda mitokondri içermekle beraber, içerdikleri glikolitik enzim konsantrasyonu ve glikojen deposu daha fazladır. Oksijen kullanma kapasitelerinin sınırlı olmasıyla ilişkili olarak, liflerin etrafındaki kan damarları ve miyogloblin içerikleri göreceli olarak daha azdır. Glikolitik liflerin yapısında miyogloblinin az olması bu kaslara soluk bir renk verdiği için, bu liflere aynı zamanda “beyaz kas lifleri” adı da verilmektedir (66). İskelet kaslarını, bu iki karakteristik özellik göz önüne alındığında 3 ayrı tipe ayırmak mümkündür;

1. Yavaş- oksidatif liflerin; miyozin ATPaz aktivitesi düşük, oksidatif kapasitesi ise yüksektir.
2. Hızlı oksidatif liflerin; miyozin ATPaz aktivitesi ile oksidatif kapasitesi yüksek olup glikolitik kapasitesi orta seviyededir. (hızlı oksidatif – glikolitik lifler de denir)
3. Hızlı glikolitik liflerin miyozin ATPaz aktivitesi ile glikolitik kapasitesi yüksektir.

Üç kas lifini birbirinden ayıran bir diğer özellik liflerin yorgunluğa karşı gösterdikleri dirençtir. Hızlı-glikolitik lifler çabuk yorulurken, yavaş oksidatif lifler yorgunluğa karşı dirençlidir. Hızlı – oksidatif kas lifleri ise yorgunluğa karşı orta derecede direnç gösterir (66).

2.4. Kas Atrofisi

İskelet kas kütlesi kaybı, kas atrofisi ya da sarkopeni olarak da adlandırılabilir, yaş ve çeşitli kronik hastalıklarla da artmaktadır (68). Besin yetersizlikleri, yaralanmalar, kanser, sepsis, diyabet, renal hastalıklar gibi sistemik hastalıklar protein degradasyonunu artırır ve kastaki protein sentezini düşürürler (69). Sarkopeni, yaş ile ilişkili kas ve fonksiyon kaybı, yüksek prevalansı ve ölümcül sonuçları nedeniyle bir halk sağlığı sorunudur (70).

İskelet kas atrofisi kas hücre ve gücünde artmış protein degradasyonu ve azalmış protein sentezinin kombinasyonu ile meydana gelen progressif bir kayıptır (71). Protein degradasyonunda rol oynayan birçok yolak vardır.

2.4.1. Ubiquitin proteazom yolağı (MAFbx/MuRF1) ve kas atrofisi

Adenozin trifosfata bağımlı ubiquitin proteazom yolağı hareketsizliğe yanıt olarak iskelet kasındaki başlıca degradasyon yolağıdır (72). Bu yolak iskelet kasındaki miyofibriyal proteinlerin yıkımına, sarkomerik protein seviyelerinde [miyozin ağır zincir (MHC) gibi] azalmaya yol açar (71,72). Ubiquitin proteazom yolağının kullanıldığı kas yıkımında başlıca 3 unsur gereklidir. E1 ligazlar, ubiquitini aktive eder, E2 ligazlar aktive olmuş ubiquitini degradasyon için hedef olan protein molekülüne transfer etmekten sorumludur ve E3 ligazlar ise, ubiquitin hedef proteine transferini düzenlemektedir (72). Ubiquitin proteazom yolağı iki adet ubiquitin E3

ligaz olan, MAFbx (atrogin-1 ya da kas atrofi F-box olarakta adlandırılmaktadır) ve muscle ring finger 1 (MuRF1)' i de içeren koordineli enzimatik sistem üzerinde etki göstererek spesifik proteinleri hedef alır ve degrade eder. Bu enzimler başlıca iskelet kaslarında ekprese edilirler ve kas atrofisinin değişik koşulları altında up-regüle edilmesi ve kas zayıflığının göstergesi olarak oldukça yaygın bir şekilde kullanılırlar (71). MAFbx ve MuRF1; Forkhead box O (FOXO) transkripsiyonel faktör ailesi tarafından düzenlenmektedir. FOXO transkripsiyonel faktör ailesi, metabolizma, apoptozis ve hücre döngüsü süreçleri ile ilişkilidir (72). Kasta FOXO3' ün aktivasyonu; atrofik genlerin transkripsiyonunda önemli rol oynar ve proteolizi stimüle ederek hızlı atrofiye neden olur (69). FOXO defosforilize olduğunda, nükleusa girer ve büyümeyi durdurur, apoptozisi teşvik eder. Akt, FOXO' u fosforilize eder ve nükleustan dışarı çıkmasına neden olur. Bu nedenle normal fizyolojik koşullarda Akt, FOXO' nun transkripsiyonel fonksiyonlarını baskılar ve FOXO' nun atrofiyi up-regüle etmesini engeller (72).

2.4.2. IGF-1/PI3K/Akt/mTOR ve kas atrofisi

İnsülin büyüme faktör- 1 (IGF-1)/ fosfotidilinositol 3 kinazı (PI3K)/ Akt (Protein B kinaz)/ mTOR (mammalian target of rapamycin) yolağının iskelet kas hipertrofisinin düzenlenmesinde rolü olduğunu belirtilmektedir. Bu yolağın aktivasyonu protein sentezini arttıran translasyon başlatıcı faktörlerde artışa sebep olur. IGF-1, fosfotidilinositol 3 kinazı (PI3K) aktive eder, bu da fosfotidilinositol-4-5 bifosfatı, membranda fosfotidilinositol-3-4-5 trifosfata fosforilize eder, bu da Akt için bir bağlanma alanı yaratır. Akt' ın aktivasyonu mTOR kinazı aktive eder ve fosforlar; mTOR protein sentezini p70S6 kinaz ve 4E-BP1' i aktive ederek ve fosforlayarak arttırır (73). Akt aktivasyonu atrofi ve hipertrofi arasındaki hücrel sinyalizasyon süreçlerinde kritik belirleyici olarak görülmektedir. Hareketsizlik durumunda, Akt aktive olamaz ve bu da FOXO aracılığı ile kas atrofisine katkıda bulunur. IGF-1/ Akt/mTOR yolağındaki değişiklikler ubiquitin proteazom ligaz, MAFbx ve MuRF1' de de direkt değişikliklere yol açar. IGF-1 yolağının aktivasyonu FOXO translokasyonunu önemli ölçüde azaltır. IGF-1 yolağının engellenmesi FOXO' nun nükleusa translokasyonuna neden olur ve proteolizi stimüle eder. mTOR hücrel süreçte, miyoblastlarının farklılaşmasında kilit düzenleyici olarak tanımlanmaktadır.

Miyojenik farklılaşmadaki rolü tam olarak belirlenemese de MyoD'nin (Myoblast determination protein) stabilizasyonunu sağlamada rol oynadığı düşünülmektedir (72).

2.4.3. Myostatin ve kas atrofisi

İskelet kas kütlesi ve gücünü düzenleyen sinyalizasyonlardan biri de myostatindir. Myostatin; transforming büyüme faktör beta (TGF- β) superfamilyasının bir üyesi olup, başlıca iskelet kasında eksprese olur. Myostatin yolağı hem gelişme döneminde hem de yetişkinlikte etkindir. Hücresel etkisi otokrin/parakrin şeklindedir ve etkisini tip II aktivin reseptör A ve B'ye bağlanarak gösterir. Bu olay SMAD2 (Mothers against decapentaplegic homolog 3 ya da SMAD ailesi üye 3 olarakta bilinir) ve SMAD 3 fosforilizasyonunu stimüle eder ve SMAD 4' e katılarak SMAD 2/3/4 kompleksini oluşturarak gen transkripsiyonunu güçlendirir. Myostatin iskelet kas büyümesinde temel düzenleyici olarak düşünülür ve inaktivasyonu güçlü bir kas hipertrofisine yol açar ve fazla ekspresyonu kas atrofisini artırır. İlginç olarak, myostatin ekspresyonunun çeşitli hastalıklarda (kanser, AIDS, kalp hastalıkları gibi) arttığı ve bunun iskelet kas zayıflığı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (74). Myostatin kas zayıflığını Akt-mTOR yolağını inhibe ederek yapmaktadır. Ubiquitin proteazomal yolağını ise, FOXO aracılığı ile up-regüle etmektedir (72).

2.4.4. Oksidatif stres

Kas zayıflığı ile ilişkili mekanizmalardan biri de oksidatif strestir; oksidatif stres, oksidant ve anti-oksidantlar arasındaki dengesizlik sonucu oluşan fizyolojik seviyenin üzerindeki reaktif oksijen türleri (ROS) olarak tanımlanırlar. Artmış ROS üretimi, iskelet kasında kalp hastalıkları, sarkopeni, immobilizasyon ve kanser sırasında oluşur. İskelet kasındaki ROS kaynaklarından biri NAD(P)H oksidaz (NOX) (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidad)' dır. Bu çoklu enzim kompleksi, NAD(P)H'ı (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) moleküler oksijeni ROS'a çevirmek için substrat olarak kullanır. NOX, iskelet kas hücresinin myostatin ve ang-II (Anjiotensi-II) gibi bazı atrofik faktörlere olan yanıtını düzenler ve Duchenne kas distrofisinde de oksidatif stresi artırır. Transforming büyüme faktör tip beta 1 (TGF- β 1), iskelet kasında patolojik durumu ve fonksiyonu düzenler. Fibrozis üretimine ek olarak TGF- β 1, iskelet kas atrofisini indükler. TGF- β 1'in kas gücünü azalttığı ve

MAFbx ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiş olsa da atrofik etkisi tam olarak anlaşılammıştır (71).

2.4.5. Sitokinler

Çeşitli çalışmalara göre kas zayıflığını arttıran çeşitli katabolik moleküler unsurlar vardır ve bunlar arasında myostatin, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin 1 β (IL-1 β) , interlökin -6 (IL-6), TNF-like weak inducer of apoptozis (TWEAK), interferon gamma (IFN γ) gibi proinflamatuvar sitokinler yer almaktadır. Bu sitokinler, kendilerine özel reseptörlere bağlanarak NFkB' yi aktive ederler (bu protein katabolik yolakta yaygın bir transkripsiyonel faktördür ve iskelet kasında proteolize yol açar). Bu nedenle nüklear faktör kappa B (NFkB) kas atrofisi ile ilgili tedavilerde temel hedef olarak göz önüne alınmaktadır (75).

2.5. Resveratrol ve Kas Atrofisi

Resveratrolün, protein degradasyonunu engellediği çeşitli çalışmalarda vurgulanmaktadır (9,10). Resveratrolün anti-kaşektik etkisini NFkB aktivitesini ve MuRF1 ekspresyonunu inhibe ederek yaptığı bildirilmektedir (76). Resveratrolün TNF- α ile indüklenen atrofilerde, AKT, p70S6K, mTOR ve 4E-BP1 fosforilasyonunu up-regüle ederek (77), deksametazon ile indüklenen atrofiler de ise, SIRT1 ve PGC-1 α aktivasyonu üzerinden MAFbx ve MuRF1 ekspresyonlarını azaltarak atrofiyi engellediği gösterilmiştir (11). Fakat resveratrolün kas kütlesi kayıplarını bloke edemeyeceği ya da geri çeviremeyeceği de belirtilmektedir (75).

2.6. Kas Hipertrofisi

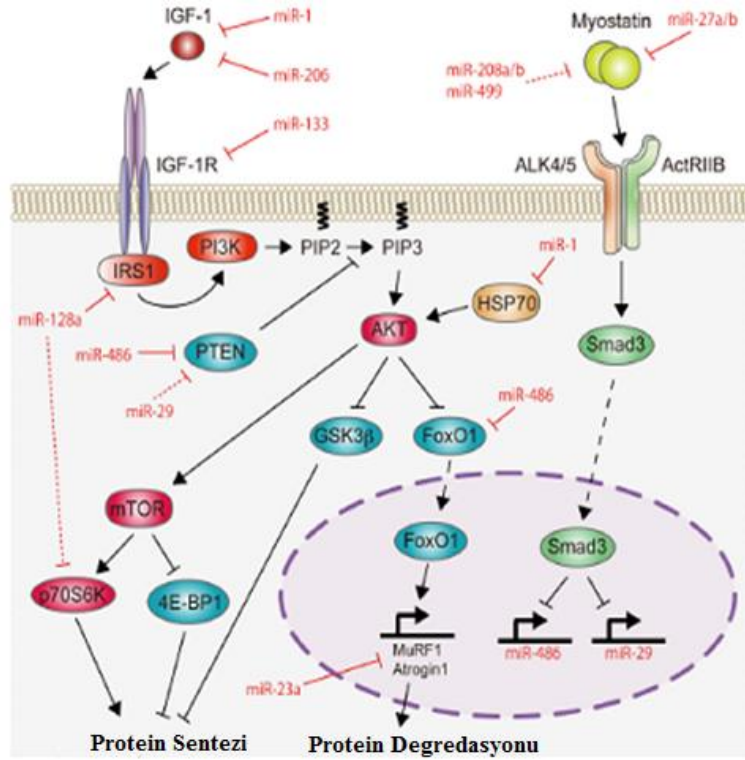
Yetişkin kasları multinükleuslar içeren miyofibrillerden oluşmaktadır ve büyüklüğünü (atrofi/ hipertrofi) ve tipini (yavaş kasılan, hızlı kasılan, yorulabilir tip) değiştirebilmektedir. Günlük mekanik aktivitesinden dolayı, kasta küçük yırtık ve doku zedelenmeleri meydana gelir, bu da fibrilleri oluşturan bileşenlerde yavaş bir döngüye sebep olur. İskelet kasının, şiddetli yaralanma ya da çok yoğun fiziksel aktiviteye yanıt olarak, güçlü bir kendini yenileme yeteneği vardır. Bu yetenek iskelet kasında kas kaybını ve kas hastalıklarına bağlı semptomları önlemede önemlidir (78). Yetişkin iskelet kas kütlesinin sürdürülmesi, kas protein sentezi ve degradasyonu arasındaki ilişki ile sürdürülür. Besin öğeleri ve mekanik stimülasyonlara yanıt olarak iskelet kas kütlesi artarken (hipertrofi), kanser kaşeksisi, açlık, immobilizasyon,

yaşlanma ve nöromusküler hastalıklar gibi çeşitli durumlarda ise iskelet kas kütlesi azalır (79). İskelet kas hipertrofisi kas kütlesinde artış ve daha önceden var olan iskelet kas fibrillerinin sayısındaki artış ile tanımlanmaktadır (80).

Kas hipertrofisinde genel olarak iki sinyalizasyon yolağının rolü olduğu vurgulanmaktadır, bunlar; IGF-1/ Akt/mTOR ve kasinörin/NFAT (nükleer faktör aktive T hücreleri) (81).

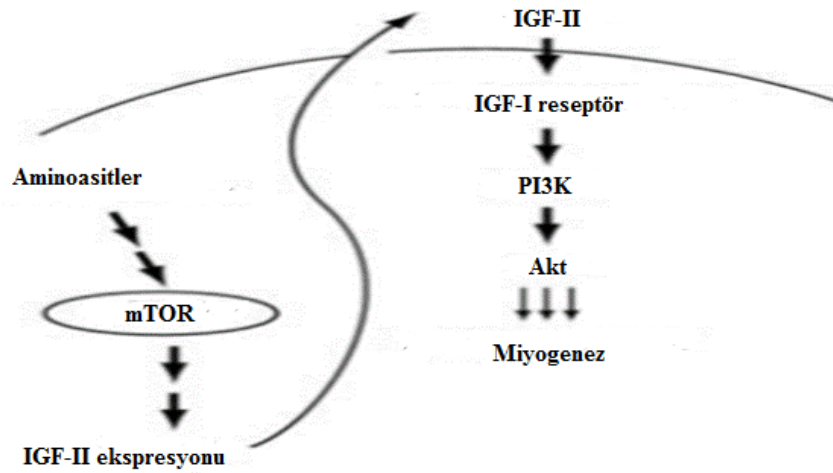
2.6.1. IGF1/PI3K/Akt/ mTOR yolağı

İskelet kas hipertrofisi, yetişkin memelilerde mevcut miyofibrillerin boyutundaki artış ile karakterizedir. Hipertrofi birçok anabolik uyarın ile indüklenebilir, bunların arasında IGF-1 en fazla çalışmış olanıdır (82). IGF-1/Akt yolağı iskelet kas kütlesini; protein sentezini stimüle edip, protein degradasyonunu inhibe ederek arttırır. IGF-1 spesifik tirozin kinaz reseptöre (IGF-1R) bağlanır ve IRS1 üzerinden fosfotidilinositol-3- kinaz (PI3K)' ı aktive eder. Aktive olan PI3K, fosfotidilinositol 3,4,5 trifosfatı (PIP3) üretir ve Akt proteininin aktivasyonunu indükler. Sonuç olarak Akt, mTOR'u aktive eder ki bu da protein sentezini kontrol eder. Akt; glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3β)' i de aktive eder böylece protein translasyonunu bloke olur. Akt; FOXO translasyonunu da engeller (FOXO; kas atrofi ilişkili genlerin regülasyonunda anahtar role sahiptir). FOXO' nun inaktivasyonu, kas protein degradasyonunu engeller. Bu şekilde IGF-1/Akt/mTOR yolağı kas hipertrofisinde merkezi rol oynar (79,81). Şekil 2.3' te protein sentez ve degradasyonundan sorumlu yolaklar ve aralarındaki etkileşim görülmektedir.



Şekil 2.3 Protein sentezi ve degradasyon yolları

Son yıllarda, IGF-1 proteininin fazla eksprese olmasının, iskelet kas hipertrofisini indüklemekte yeterli olduğu gösterilmiştir (80,83). IGF-1' in, protein sentezini regüle eden yolları aktive ettiği ve iskelet kas atrofisinde de anahtar role sahip mediyatörlerin (ubuquitin-ligaz MuRF1 ve MAFbx) transkripsiyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (80). IGF'in kas hipertrofisindeki, rejenerasyonundaki etkileri çok net olarak tanımlanmıştır. IGF; PI3K/Akt aksı üzerinden miyojenik faktörleri regüle ederek miyogenez sürecinde etkin olmaktadır. Diğer taraftan IGF-II' nin otokrin etkisinin miyoblast farklılaşmasını başlattığı bilinmekte ancak miyojenik etkisinin nasıl düzenlendiği tam olarak bilinmemektedir. Erbay ve arkadaşlarının (84), yaptığı çalışmada, IGF-II ekspresyonunun; IGF aksının düzenlenmesinde önemli olduğu, iskelet miyositlerinin farklılaşması için otokrin IGF-II' nin transkripsiyonun gerekli olduğu ve bunun mTOR tarafından nütrisyonel durumla ilişkili olarak kontrol altında olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.4) (84).



Şekil 2.4 mTOR- IGF-II ekspresyonu

Kas hücre farklılaşması IGF-1 ve IGF-II ile ilişkilidir. IGF-II, etkisini IGF-1R bağlanarak gösterir. Büyüme faktörlerinin miyoblast farklılaşmasındaki etkisi temel olarak PI3K/Akt/mTOR/p70S6K yolağı ile ilişkilidir. Akt bir serin/treonin kinaz olup sitozolde yer almaktadır. Akt'ın 3 izoformu bulunmaktadır; Akt 1,2 ve 3. İskelet kasında Akt 1 ve 2 daha baskındır. Ancak iskelet kasında IGF-1'in, Akt ilişkili büyüme etkisi Akt 1 üzerindedir. Akt 2 daha çok kas glukoz metabolizması ile ilişkili görülmektedir. İnsülin ve IGF-1 stimülasyonu Akt'ın translokasyonuna sebep olur ve Akt plasma membranına çıkarak burada serin ve treonini fosforilize ederek tekrar nükleus ya da sitozoldeki yerine döner. IGF-1'in Akt ilişkili etkisi 2 türdür; anabolik etki ve anti-katabolik etki. Akt hücre büyümesi ve protein sentezini temel olarak mTOR ve p70S6K'ı fosforilize ederek destekler. Rapamycin ile müdahale mTOR inhibisyonuna neden olarak hem miyojenik farklılaşmayı hem de gelişme sırasındaki miyofibril büyümesini engeller. Akt'ın anti-katabolik etkisi ise, fosforilizasyon ile FOXO3a ve GSK3 inhibisyonuna neden olarak, proteolizi inaktive etmesinden kaynaklanmaktadır. FOXO3'ün fosforilizasyonu kas gelişimini negatif olarak düzenleyen MuRF1 ve MAFbx gibi genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda rol oynar (78).

Buna karşın, myostatin sinyalizasyonu iskelet kas kütlelerinde protein sentezini azaltarak negatif olarak etkiler ve inaktivasyonu iskelet kas hipertrofisini

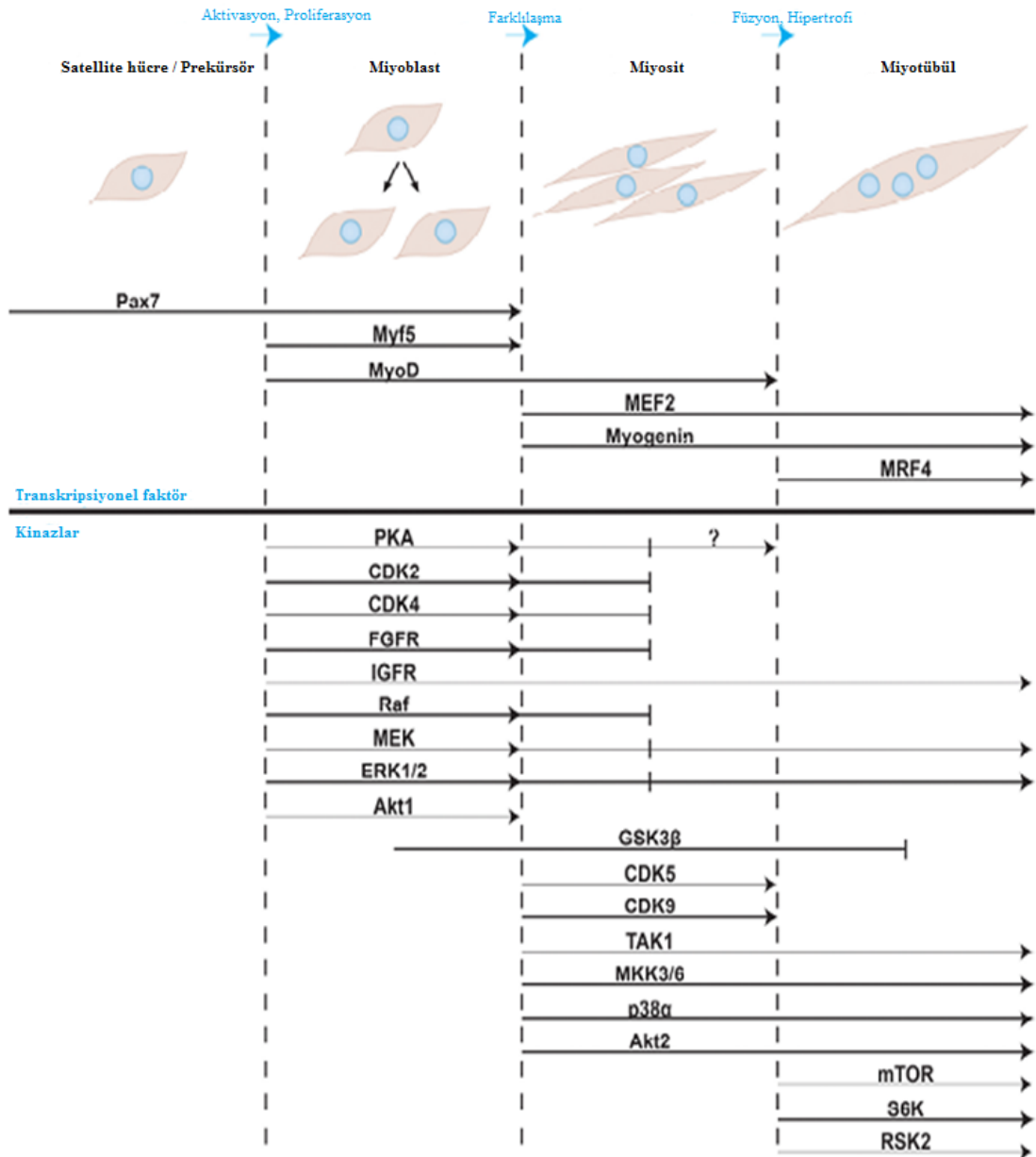
indükleyebilir ya da fazla eksprese olması kas atrofisine neden olabilir (1,85). Son yıllarda, TNF- α 'nın NFkB transkripsiyonel yolağını aktive ettiği ve bu yolağın da iskelet kas atrofisi için yeterli olduğu bildirilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında IGF-1 yolağının aktive edilmesi ya da TNF- α 'nın ve myostatinin inaktivasyonunun kas hipertrofisinde önemli hedefler olduğu vurgulanmaktadır (80).

2.6.2. Kalsinörin yolağı;

Kas hipertrofisi boyunca Akt/mTOR yolağı, up-regüle olurken, zıttı olarak kalsinörin yolağı, hipertrofi sırasında aktive olmaz (81). Genel olarak kalsinörin (CnA) yolağı, kas atrofisinde etkin gösterilirken; kas hipertrofisinde 1990'ların sonlarına doğru çıkan çalışmalardan IGF-1 aracılığı ile gerçekleşen büyümede PI3K/Akt /mTOR sinyalizasyonuna ek olarak CnA-NFAT' e de ihtiyaç duymakta olduğuna dair veriler yayımlanmıştır. Buna göre, IGF-1; CnA' yı aktive ederek, onun downstream hedefi olan NFAT – transkripsiyonel faktörü etkilemektedir. IGF-1' e yanıt olarak gelişen kas gelişimi için CnA' nın aktivasyonun gerekli olduğunda vurgulanmaktadır (89).

2.7. Miyogenez ve Miyojenik Faktörler

Yetişkin tipi miyogenez; satellite hücrelerin, [yeni kas hücrelerinin oluşumunu sağlayan (uydu) hücreler] (87) yeni fibrillere farklılaşma potansiyeline bağlıdır (88). Miyogenez süreci çok çeşitli miyojenik transkripsiyonel faktörler ve kinazların kontrolü altındadır (Şekil 2.5) (89,13). Miyojenik regülatör faktörler (MRFs) olarak da bilinen kasa spesifik bu basit helix-loop-helix transkripsiyonel faktörler Myf 5, MyoD (miyoblast belirleyici protein), myogenin ve MRF4 (kas spesifik düzenleyici faktör 4) proteinlerini içermektedir (90,91). Bunlar miyojenik bilgi için önemlidirler (78).

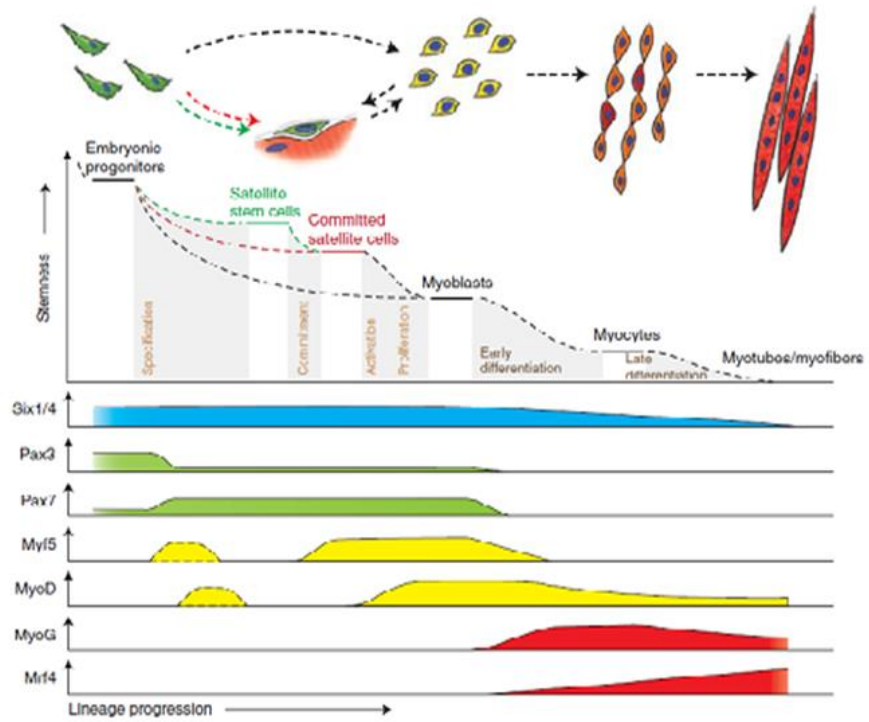


Şekil 2.5 Miyogenez basamaklarını düzenleyen transkripsiyonel faktörler ve kinazlar

Basit helix- loop- helix faktör MyoD, ve onun bazı hücre tiplerinin (fibroblastlar gibi) miyotübüllerin içine girebilecek şekilde farklılaştırma yeteneği 1987’ de tanımlanmıştır. Ardından 3 farklı, daha fazla miyojenik basit helix –loop- helix faktörler olan Myf 5, myogenin ve MRF4 (Myf6 olarakta bilinir), keşfedilmiştir (88). Myf5 ve MyoD başlıca kas spesifikasyonu ve kas olmayan hücrelerin fibroblast gibi kasa çevrilmesi ile ilişkili iken, myogenin ve MRF4 miyogenezin geç evrelerinde görev alır, miyotübüllerin formasyonu ve olgunlaşmasına izin verir (Şekil 2.6). Kas

hasarına yanıt olarak satelleti hücreler, hasarlı miyofibriller boyunca aktive olur, yeni miyotübüller oluşturarak hasarlı bölgeye proliferer olur ve göç ederler (78).

Satellite hücre aktivasyonundan sonra, kas regülatör faktörler olan, Myf5 ve MyoD' nin ekspresyonu gerçekleşir ve farklılaşmanın başlangıcında, myogenin ve MRF4 ekspresyon edilir (92). MyoD kas rejenerasyonunda anahtar miyojenik transkripsiyonel faktördür. Kas rejenerasyonunda MyoD ekspresyonu, çeşitli kasa özel genleri [gelişimsel myosin heavy chain (MHCd, sadece rejenere fibrillerde bulunur) ve myogenin gibi] kontrol eder. Myogeninin ekspresyonu miyotübül formasyonu ile başlar ve miyoblast füzyonuna yol açan anahtar faktördür (78) ve fonksiyonel iskelet kasının gelişmesi için elzemdir (93). Myf5 embriyonik gelişme döneminde ilk ekspresyon edilen MRF' dir. Ancak daha sonra Myf5' ten yoksun farelerde; sürecin MyoD basamağından devamı; benzer şekilde MyoD' den yoksun farelerde de; Myf5 basamağı ve ekspresyonu artırılarak bu durumu kompanse ettiği gösterilmiştir. Bu ilginç sonuçlar Myf5 ve MyoD' nin miyogenez sırasında fazlaca bulunmasından kaynaklandığı şeklinde açıklanmıştır (88). MyoD' nin aktive olmuş miyoblastların farklılaşma potansiyellerini belirlediği, myogenin ve miyosit arttırıcı faktör 2 (MEF-2) ile birlikte farklılaşmayı yönettiği bilinmektedir (89). Myogeninin ve MRF4 hiyerarşik olarak MyoD ve Myf 5' 1, down-regüle ederler ve kas farklılaşması ve miyofibril formasyonunda çok daha direkt etkiye sahiptirler (94). Myogenin miyoblastların miyotübüllere füzyonunda elzem olup, bu da miyogenezdeki kritik basamaktır (95). Son olarak ise, MRF4 hipertrofi için gereklidir. Bu transkripsiyonel faktörler tek başlarına rol oynamamakla birlikte kompleks miyogenez sürecinin her basamağını kontrol etmektedirler (89).



Şekil 2.6 Miyojenik süreç boyunca transkripsiyonel faktörler

İnsülin büyüme faktörü (IGF) yolu MRF ailesindeki proteinleri özellikle MyoD ve myogenini, regüle edebilmektedir (78). Her ne kadar IGF'nin, MyoD ekspresyonunu ya da aktivitesini nasıl düzenlediği tam olarak kesinleşmese de değişik mekanizmalardan bahsedilmektedir. Bu öne sürülen mekanizmalardan bir tanesi IGF-1'in, MyoD'nin aktivitesini mTOR-miR-1'e bağımlı olarak proteinin stabilizasyonunu sağlayarak ve de transkripsiyonunu arttırarak yaptığı yönündedir (96). Ancak, IGF'nin myogenin ekspresyonunu arttırdığı da belirtilmektedir (97). Miyogenez esnasında myogeninin, MyoD kontrolündeki ekspresyonu elzemdir. Bu nedenle, IGF-1'in, MyoD ekspresyon ve aktivitesini kontrol ettiği düşünülürse bu şekilde myogenin ekspresyonunu da bir şekilde kontrol etmesi ve kas farklılaşmasının indüklemesi beklenir. Ancak IGF-1'in, myogenin ekspresyonunu MyoD'den bağımsız olarak regüle ediyor olabileceği de öne sürülmektedir (98).

2.7.1. Miyogenez, miyojenik faktörler ve resveratrol

Nutrigenomiğe göre; biyoaktif besin içeriklerinin gen ekspresyonlarını, protein sentezini, degradasyonunu ve post translasyonel modifikasyonları etkileyebildiğini açıklamıştır. Resveratrol; doğal olarak üzüm ve diğer meyvelerde bulunur ve sağlık üzerine birçok olumlu etkisi (kardiyo-nöroprotektif, bağışıklığı düzenleyici, DNA onarımı, mitokondriyal hastalıkların önlenmesi gibi) vardır (12). Resveratrolün sağlık üzerine birçok olumlu etkisi gösterilmiş olmasına rağmen iskelet kaslarına yönelik faydalı etkileri literatürde diğer dokulara kıyasla daha çalışılmış bir konudur. Resveratrolün protein katabolizması ve kas fonksiyonlarını değiştirdiği (99) ve iskelet kas hücre farklılaşmasında aktif rolü olduğu öne sürülmektedir (12). Ancak miyogenez sürecindeki hedef proteinler üzerine etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Miyogenez; MRF'ler tarafından düzenlenen multibasamaklı bir süreçtir ve miyojenik hücrelerin; tek çekirdekli farklılaşmamış miyoblastların elongasyonu ile çok çekirdekli miyotübüllere dönüşmesidir. İskelet kas hipertrofisi ise daha önceden var olan iskelet kas fibrillerinin protein sentezi ile boyutlarındaki artış olarak tanımlanabilir ve başlıca IGF-1/PI3-K/Akt/mTOR yolağı ile düzenlenmektedir (12).

Resveratrol ile yapılan çalışma sonuçlarına göre resveratrolün bazı gen ekspresyonları ve mitokondriyal biyogenezi indüklediği (63), ön farklılaşma ajanı gibi davrandığı, kastaki ön farklılaşma göstergelerini ve transkripsiyonel faktörleri (myogenin, Scrp3) up-regüle ettiği, miyozin ağır zincir içeriğini güçlü bir şekilde arttırdığı gösterilmiş ve tüm bu sonuçlar ışığında resveratrolün iskelet kaslarında ön farklılaşmayı düzenleyebilecek özelliklerinin olduğu öne sürülmüştür (100). TNF- α 'nin kas erimesi ve kas farklılaşmasının bozulması ile ilişkili patolojide hayati öneme sahip olduğu vurgulanmaktadır. TNF- α maruziyetinin resveratrol takviyesinin varlığı ve yokluğunda kas hipertrofisi ve atrofisi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya göre; C2C12 miyotübülleri resveratrol varlığında ve yokluğunda TNF- α maruziyetine bırakılmıştır. TNF- α ile müdahale edilen miyotübüllerde kas spesifik ubiquitin ligaz MAFbx ve MuRF1'lerde hiperekspresyon ve bu değişiklikler ile bağlantılı olarak anabolik hedeflerde (Akt, mTOR, p70S6K ve 4E-BP1) azalma ve katabolik hedeflerde (FOXO1, FOXO3a, MAFbx, MuRF1) artış gözlemlenmiştir. Resveratrol ile müdahale, TNF- α 'nın indüklediği protein kaybını önlemiş ve Akt, mTOR, p70S6K

ve 4E-BP1, FOXO1 ekspresyonlarındaki azalmayı geriye çevirmiştir. Çalışmanın sonunda resveratrol uygulanan miyotübüllerde hipertrofik görüntü ve miyotübül çaplarında artış saptanmıştır. Resveratrolün sadece TNF- α 'nın indüklediği atrofik yanıtı baskılamakla kalmayıp miyotübüllerdeki hipertrofik yolları da indüklediği, miyotübül hipertrofisinin Akt/mTOR yolağının aktivitesine bağlı olduğu ve resveratrolün bu yolağı regüle ettiği bu nedenle de kas kütlesinin geliştirilmesinde olası strateji olabileceğini öne sürmüşlerdir (11). *In vitro* olarak C2C12 hücreleri resveratrol ile müdahale edilerek hücrelerde meydana gelen morfolojik ve transkripsiyonel faktör proteinlerin miktarlarının incelendiği başka bir çalışmada ise; resveratrolün farklılaşmayı indüklemeye üzerine etkisine bakmak için MRF'lerden 2 erken faz proteinlerinin miktarına bakılmıştır (MyoD ve Myf-5, ki bunlar farklılaşmanın indüklenmesinde anahtar göstergelerdir, miyogenezin erken evrelerinde anahtar rol oynarlar). Resveratrol ile müdahale sonrasında Myf-5 ve MyoD protein düzeylerinde anlamlı artış saptanmıştır. Bu sonuç; resveratrolün farklılaşmayı indükleyebileceğinin göstergesi olarak belirtilmiştir ve resveratrol ile müdahalede miyozin ağır zincir protein ekspresyonlarının tüm farklılaşma basamaklarında arttığı vurgulanmıştır. Yine aynı çalışmada, resveratrol ile müdahale pro-IGF-1R seviyelerinde artışa eğilim ve analiz edilen tüm farklılaşma zamanlarında IGF-1R protein seviyelerinde artışa neden olmuştur. Beklendiği gibi resveratrol; Akt aktivasyonunda da artışa sebep olmuştur (IGF-1 iskelet kasında major anabolik faktördür ve Akt yolağının miyojenik ve anabolik etkilerini artırır). Resveratrol müdahalesi sonrası yeni oluşmuş miyotübüllerin boyutunda artış, boyunda uzama gösterilmiş ve bunun hipertrofi oluşumu için kanıt olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada ayrıca resveratrolün hipertrofik süreçlerle ilişkisini kanıtlamak için müdahale sonrası protein içerikleri araştırılmış ve önemli miyozin ağır zincir protein içeriklerinin resveratrol müdahalesi sonrası arttığı gösterilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre resveratrolün; MRF'lerin (Myf-5, MyoD ve Myogenin gibi) erken ekspresyonunu, kas biyogösterge proteinleri (miyozin ağır zincir) ve iskelet yapısal protein süreçlerini teşvik ettiği ve IGF-1 yolağını stimüle ederek hipertrofi üzerine pozitif etki gösterdiği vurgulanmıştır. Bu çalışma sonucunda resveratrolün miyogenez ve hipertrofiyi *in vitro* olarak kontrol edebileceği belirtilmiştir (12).

Resveratrolün protein degradasyonunu azalttığı *in vitro* çalışmalarda (9,10) gösterilmiş olsa da, *in vivo* çalışmalarda bu etkinin oluşup oluşmadığı bir tartışma konusudur. Resveratrolün, *in vitro* çalışmalarda kas hipertrofindeki başlıca yollardan biri olan Akt (protein kinaz B) yolağını (11,12) ve miyojenik faktörleri stimüle ederek miyogenezini uyardığı gösterilmiştir (12). Ancak resveratrolün *in vivo* olarak miyojenik faktörler üzerine etkisi çok fazla çalışılmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Yeri ve Zamanı

Çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Deneysel Hayvanlar Etik Kurulunun 11/05/2015 tarih ve 15/23 sayılı kararı ile uygun bulunmuştur (Ek 1). Araştırmada kullanılan cihaz ve diğer gereçler Ek 2’ de, kimyasal maddeler Ek 3’ te belirtilmiştir.

Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Araştırma Merkezi’nde gerçekleştirilen çalışmada, Mus Musculus Swiss Albino türü, genç-erişkin (7 haftalık) normal ağırlıkta erkek fareler kullanılmıştır. Deneysel hayvanlar çalışmadan bir hafta önce laboratuvara getirilerek adaptasyonları sağlanmıştır. Fareler çalışma süresince, oda sıcaklığı 22 ± 1 °C, bağıl nemi %50-60, ışık periyodu 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda barındırılmış ve bakılmıştır. Çalışma boyunca farelerin su ve pellete ulaşmaları *ad libitum* olarak sağlanmıştır.

3.2. Yöntem

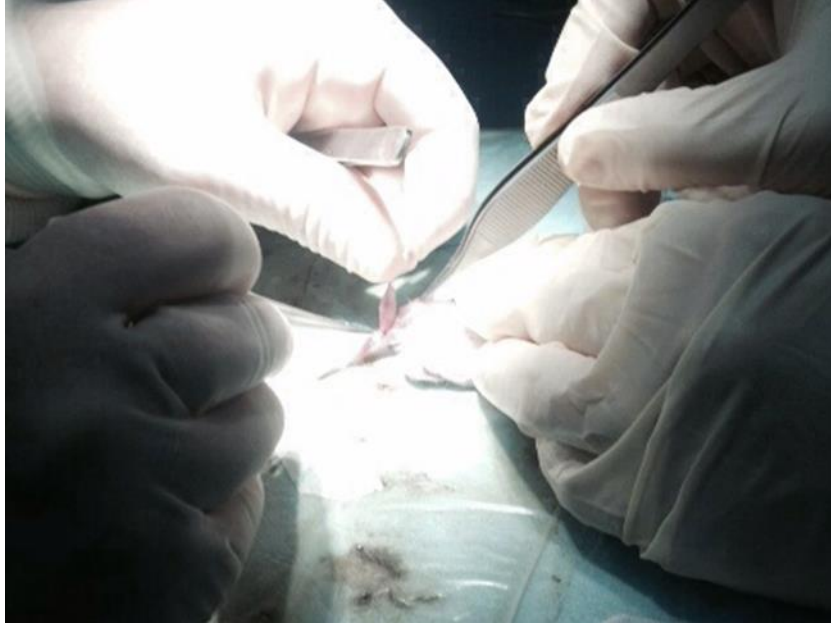
Bu çalışma; her biri 7 fareden oluşacak şekilde çalışma grubu (resveratrol uygulamasının yapıldığı grup) ve kontrol grubu (uygulama yapılmayan grup) olmak üzere toplam 14 Swiss Albino erkek farede yapılmıştır. Çalışma grubuna ardışık 7 gün boyunca saat 10.00’ da 20 mg/kg/gün trans-resveratrol intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile uygulanmış ve resveratrol müdahalesinin vücut ağırlığı, gastrocnemius kas ağırlığı, mTOR ve myogenin düzeyleri üzerine etkileri incelenmiştir.

3.2.1. Gruplandırma ve müdahale prosedürü

Çalışma için 14 Swiss Albino erkek fare, rastgele seçilerek her grupta 7 fare olacak şekilde çalışma grubu (resveratrol uygulamasının yapıldığı grup) ve kontrol grubu olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Çalışma grubuna ardışık 7 gün boyunca saat 10.00’ da 20 mg/kg/gün trans-resveratrol intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile uygulanmıştır. Uygulanacak doz, *in vivo* çalışmalardaki intraperitoneal resveratrol uygulamaları göz önüne alınarak belirlenmiştir (101-108). Çalışmanın birinci ve 7. günün sonunda farelerin ağırlıkları sartorius marka hassas tartı kullanılarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

3.2.2. Kas ağırlıklarının tayini

Yedinci gün trans-resveratrolün intraperitoneal uygulamasından 1 saat sonra hayvanların sağ gastroknemius kaslarının çıkartılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Gastroknemius kasları genel anestezi altında çıkartılmıştır. Bu amaçla 90 mg/kg dozunda ketamin ve 10 mg/kg dozunda Xylazin intraperitoneal yolla verilerek çalışma ve kontrol grubunun sağ gastroknemius kasları çıkartılmıştır (Resim 3.1). Kaslar çıkartıldıktan sonra 250 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla ketamin uygulanarak sakrifikasyon tamamlanmıştır. Çıkartılan kaslar sartorius marka hassas terazi kullanılarak ölçülmüş ve kas ağırlıkları kaydedilmiştir. Bunu takiben gastroknemius kasları Eliza analizi için steril kaplara konularak -80 °C' de saklanmıştır.



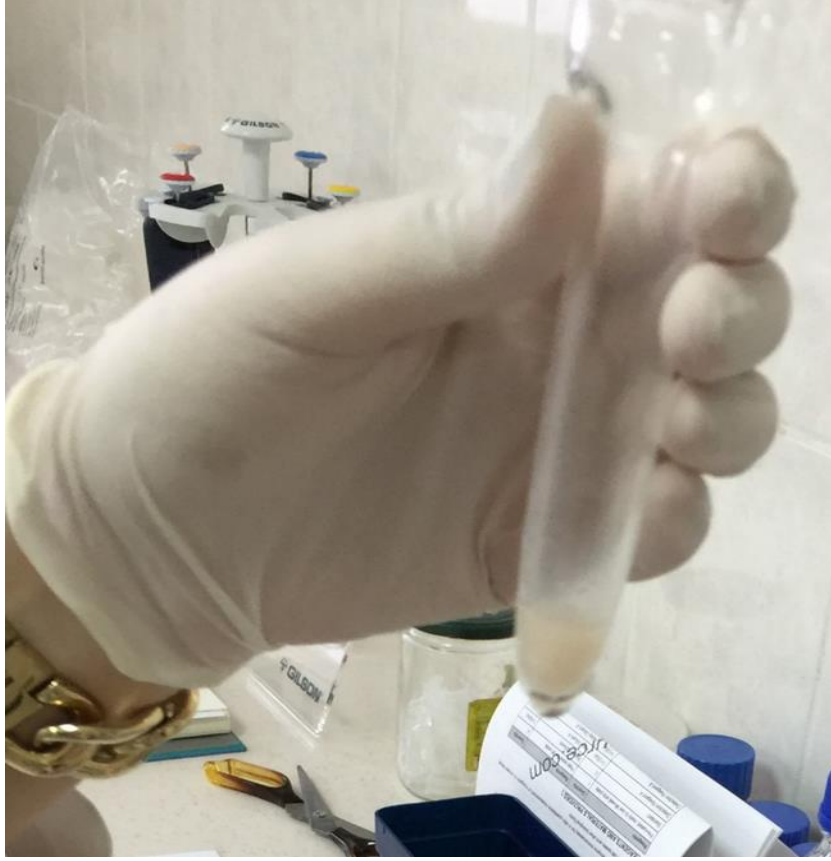
Resim 3.1 Genel anestezi altında gastroknemius kaslarının çıkartılması

3.2.3. Protein izolasyonu

Eliza analizi için -80 °C’ de muhafaza edilen dokulara protein izolasyonu işlemi uygulanmıştır. Protein izolasyonu için dokular buz içerisindeki cam homojenizatörlere konularak ezme işlemi gerçekleştirilmiştir (Resim 3.2). Daha sonra üzerine fosfat tampon solüsyonu (PBS) (0.02 mol/L Ph; 7-7.2) eklenerek homojen hale getirilmiş (Resim 3.3) ve ependorf tüplere alınmıştır. Dondur-çöz işlemi uygulanarak lizis sağlanmıştır. Homojenizatlar soğutmalı santrifüjde 3400 rpm de 5dk +4 derecede santrifüj edilerek dokudan 2 faz elde edilmiştir. Üst faz (süpernatantlar) yeni ependorf tüplere aktarılmış ve -80 dereceye kaldırılmıştır.



Resim 3.2 Protein izolasyonu birinci aşama



Resim 3.3 Protein izolasyonu ikinci aşama

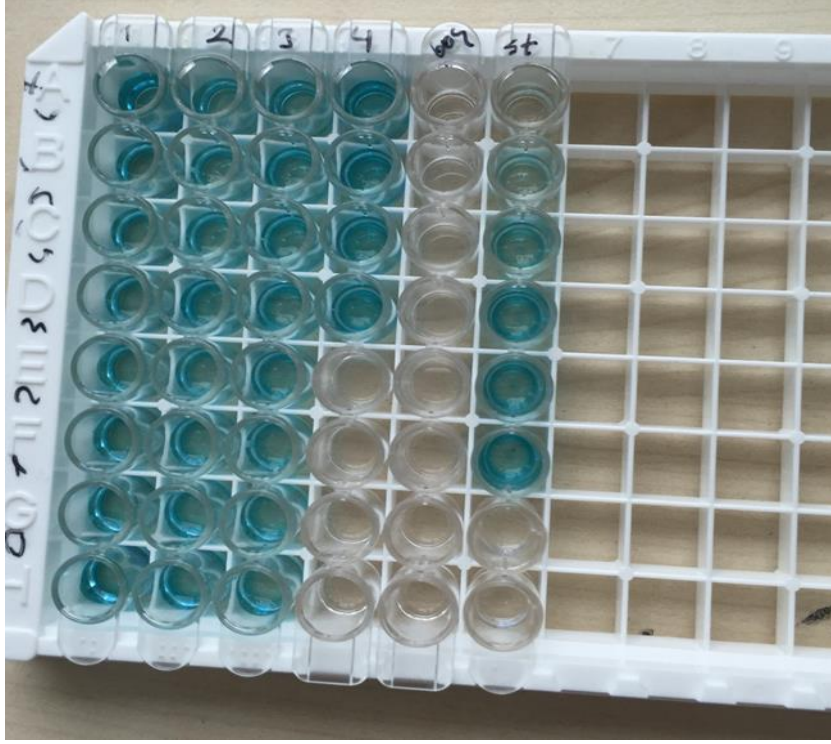
3.2.4. Bradford yöntemi ile protein tayini

Total protein içeriğinin belirlenmesi Bradford tarafından geliştirilen ve comassie brillant blue g-250 boyasının kullanıldığı metotla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen uygulama gruplarının her birine Bradford analiz yöntemi uygulanmıştır. Deney karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Bradford solüsyonu 5X olarak hazırlanmıştır ve karanlık ortamda +4' de saklanmıştır. Hazırlanan 5X solüsyonu 1X'e seyreltilerek süzölmüştür. Bovine serum albumin (BSA) taze olarak, 1mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler hazırlanırken 15 µL örnek + 235 µL distile su olacak şekilde cam tüplere konulmuştur. Kontrol hazırlanırken kör olarak Bradford ve distile su içermelidir. Tüplere sırasıyla Bradford solüsyonu, distile su, örnek olacak şekilde koyulmuştur. Hazırlanan tüpler karanlık ortamda 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler iyice vortekslenerek ve Eliza plakaya pipetle konulmuştur. 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Epok) olarak ölçülen absorbans değerlerine

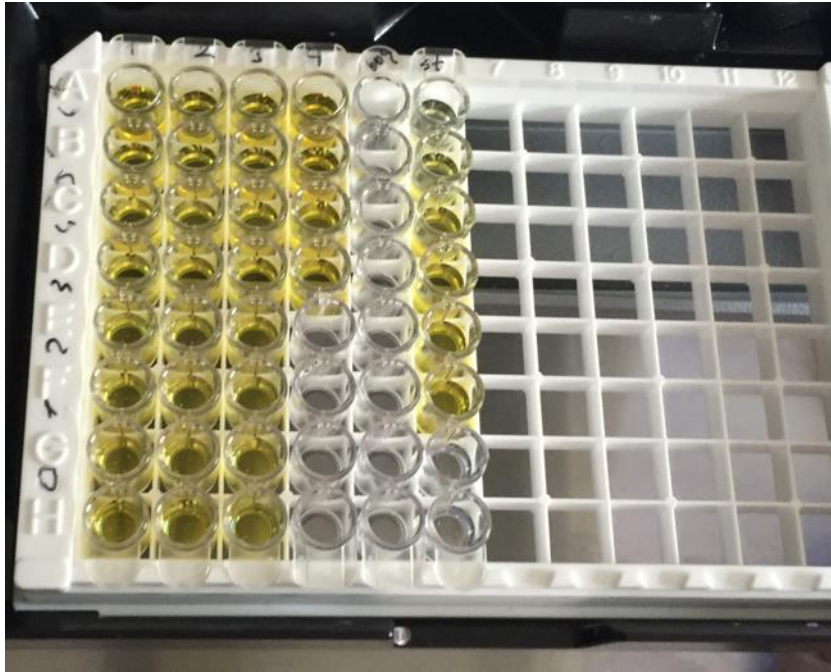
göre derişimler belirlenmiş ve belirlenen derişimlere uygun grafik formüle edilerek çizilmiştir.

3.2.5. mTOR Eliza analizi

1. Tüm kuyucuklara 100 μ L örnek kondu.
2. PBS (ph7-7.2) kör kontrol kuyucuğa eklendi.
3. 10 μ L denge solüsyonundan 100 μ L' lik örneklerle dağıtıldı.
4. Kör kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 μ L konjugat eklendi. 1 saat 37°C de inkübe edildi.
5. Eliza yıkayıcıda (otomatik yıkayıcı) plaka 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı (350-400 μ L/kuyucuk/yıkama). Her yıkama arasında yıkama zamanının 10 saniye ve sarsma zamanı 5 saniye olarak ayarlandı (Resim 3.4).
6. Önce 50 μ L substrat A , sonra 50 μ L substrat B kör kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere tüm kuyucuklara eklendi. 10-15 dakika 37 °C de inkübe edildi.
7. Kör kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her kuyucuğa 50 μ L stop solüsyonundan eklendi.
8. Spektrofotometri de 450 nm'de okutuldu (Resim 3.5) .
9. Analiz triplike olarak tekrar edildi.



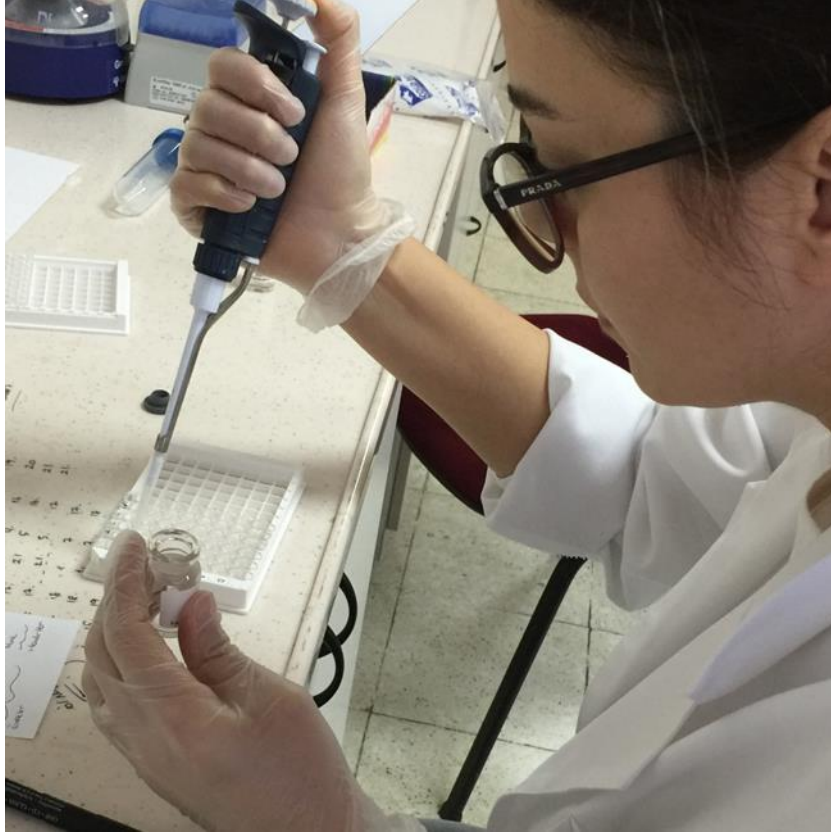
Resim 3.4 Eliza yıkama sonrası görünüm



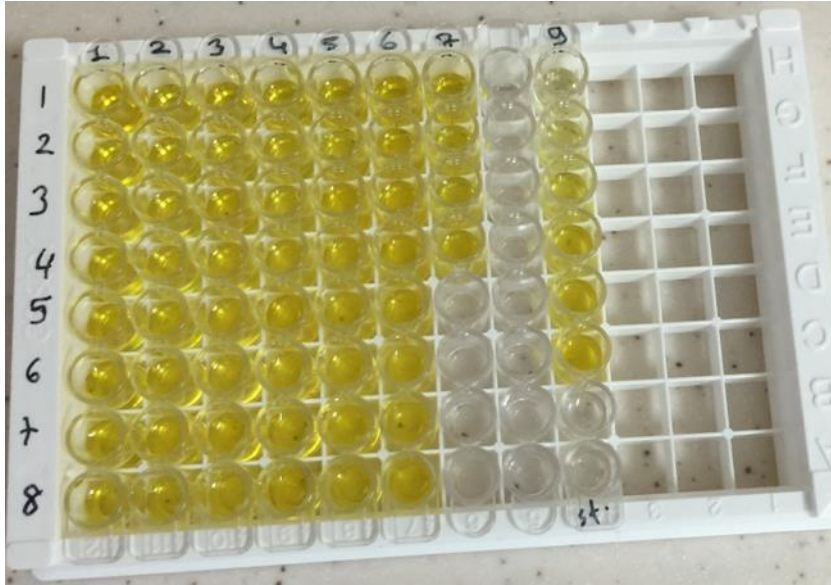
Resim 3.5 Spektrofotometri işlemi sonrası görünüm

3.2.6. Myogenin Eliza analizi

1. Standartlar hazırlanıp, 1 kuyucuk kör olacak şekilde tüm kuyucuklara 100 μ L dağıtıldı ve 37 °C de 2 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında tüm kuyucuklardaki sıvılar alındı ve yıkama yapıldı.
3. 100 μ L Reajan A ilave edilerek 37 °C de 1 saat inkübasyona bırakıldı (Resim 3.6).
4. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklardaki sıvılar alındı, 350 μ L yıkama tamponu ile toplamda 3 kez yıkama yapıldı. Kalan sıvı kurutma kağıdına alınarak uzaklaştırıldı.
5. 100 μ L reajan B ekleyerek 30 dakika 37 °C de inkübe edildi.
6. Tüm solüsyonlar uzaklaştırılıp, 350 μ L yıkama tamponu ile toplamda 5 kez olacak şekilde yıkama yapıldı. 1-2 dakika bekletildikten sonra kalan sıvı kurutma kağıdına alınarak uzaklaştırıldı.
7. 90 μ L TMB substrat eklendi. 15-25 dakika 37 °C (30 dakikayı aşmayacak şekilde) inkübasyona bırakıldı.
8. 50 μ L stop solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi, sıvının renginin stop solüsyonunun eklenmesi ile sarıya döndüğü gözlemlendi (Resim 3.7).
9. Hızlı bir şekilde mikropilaka (spektrofotometre) okuyucuda 450 nm 'de okuma yapıldı.
10. Analiz triplike olarak tekrar edildi.



Resim 3.6 Reajan A ilave işlemi



Resim 3.7 Stop solüsyonu ilave işlemi sonrası görünüm

3.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS Statistics 22 (SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılıma uygun olduğu saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken nicel verilerin karşılaştırılmasında, parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Student t- test kullanılmıştır. Parametrelerin grup içi ilk ağırlık son ağırlık karşılaştırmalarında Paired sample t-test, parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde ise Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Ağırlık Değişimi

Bu çalışma, çalışma grubu (n:7) ve kontrol grubu (n:7) olmak üzere toplam 14 fare üzerinde yapılmıştır. Tablo 4.1’ de çalışma ve kontrol grubundaki farelerin 1. ve 7. gün ağırlıkları gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Çalışma ve kontrol grubu 1. gün ve 7. gün ağırlıkları

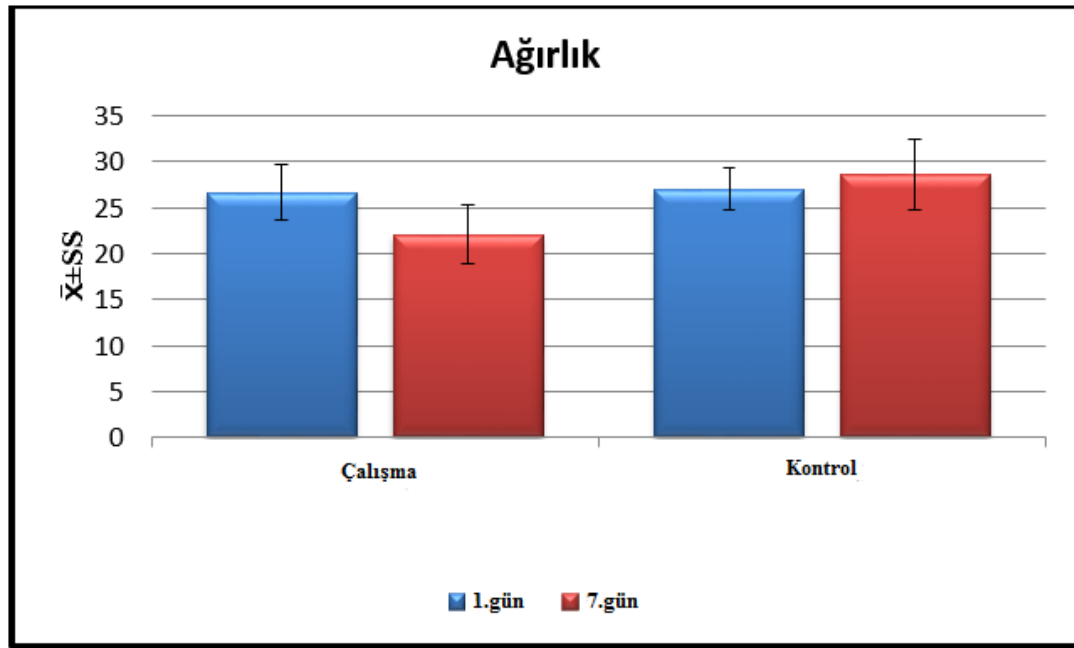
Denekler	Çalışma Grubu Ağırlık (g)			Kontrol Grubu Ağırlık (g)		
	1.Gün	7.Gün	Fark	1.Gün	7.Gün	Fark
1	24.5	21.7	-2.8	24.8	26.6	1.8
2	24.2	19.4	-4.8	28.8	30.8	2
3	25.7	26.9	1.2	24	23.6	-0.4
4	24.2	18.1	-6.1	25.6	25.3	-0.3
5	28.7	23.3	-5.4	29.1	32.1	3
6	26.7	20.1	-6.6	29.7	34	4.3
7	32.4	25.3	-7.1	27.4	28	0.6

Tablo 4.2’ de gruplar arasında 1.gün ve 7. gün ağırlıklarının ortalamaları gösterilmiştir. Çalışma grubunun 1. gün ağırlık ortalaması 26.63 ± 3.02 g iken, kontrol grubunun ise 27.06 ± 2.27 g olup gruplar arasında başlangıç ağırlık ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Yedinci gün ağırlık ortalamaları açısından karşılaştırıldığında ise; çalışma grubunun 7. gün ağırlık ortalaması (22.11 ± 3.22 g), kontrol grubundan (28.63 ± 3.80 g) istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çalışma grubunda; 1.gün ağırlık ortalamasına göre 7.gün ağırlık ortalamasında görülen düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol grubunda ise 1.gün ağırlık ortalamasına göre 7.gün ağırlık ortalamasında artış görülmekle birlikte, görülen bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4.2).

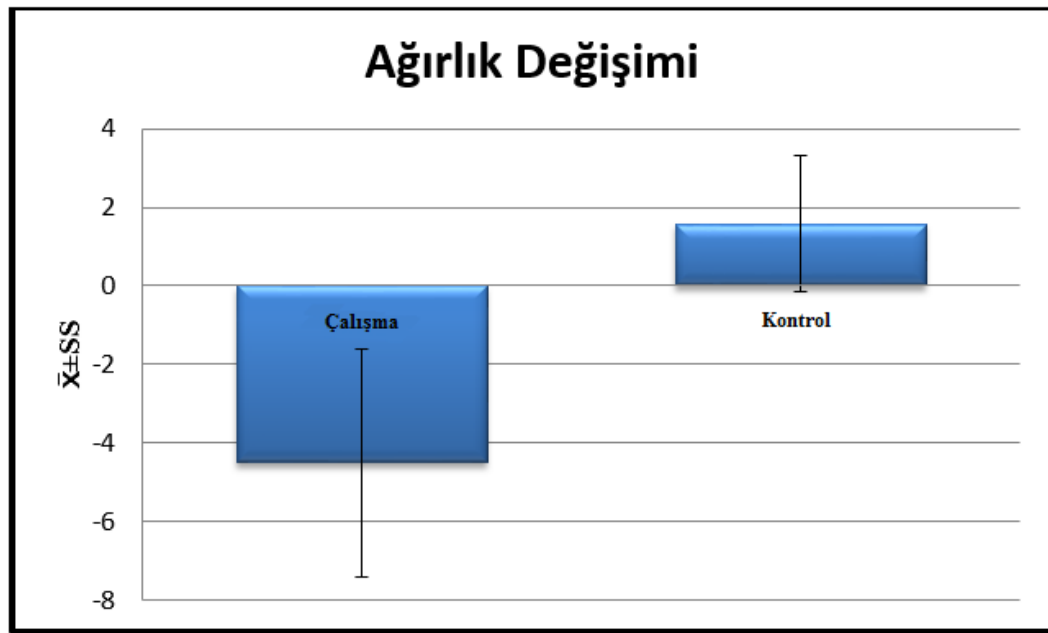
Tablo 4.2 Grupların 1. gün ve 7. gün ağırlıkları

Ağırlık (g)	Çalışma Grubu	Kontrol Grubu	¹ p
	$\bar{x}\pm SS$	$\bar{x}\pm SS$	
1.gün	26.63±3.02	27.06±2.27	0.769
7.gün	22.11±3.22	28.63±3.80	0.005*
Fark	-4.51±2.89	1.57±1.73	0.001*
² p	0.006*	0.054	

¹Student t test² Paired sample t test* $p<0.05$ 

Grafik 4.1 Grupların ortalama ağırlık değişim grafiği

Çalışma grubunda 1. gün ağırlığına göre 7. gün ağırlığında düşüş görülürken, kontrol grubunda ağırlıkta artış görülmüş ve bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 4.1 ve Grafik 4.2).



Grafik 4.2 Gruplar arasındaki ağırlık değişimi

4.2. Sağ Gastrokneius Kas Ağırlıkları

Sakrifikasyon sonrası çalışma ve kontrol grubunun sağ gastroknemius kas ağırlıkları Tablo 4.3' te sunulmuştur.

Tablo 4.3 Grupların sağ gastroknemius kas ağırlıkları

Denekler	Kas ağırlığı (g)	
	Çalışma Grubu	Kontrol Grubu
1	0.0810	0.1268
2	0.0850	0.1507
3	0.1181	0.1068
4	0.0350	0.0843
5	0.0909	0.1378
6	0.0993	0.1389
7	0.1188	0.1029

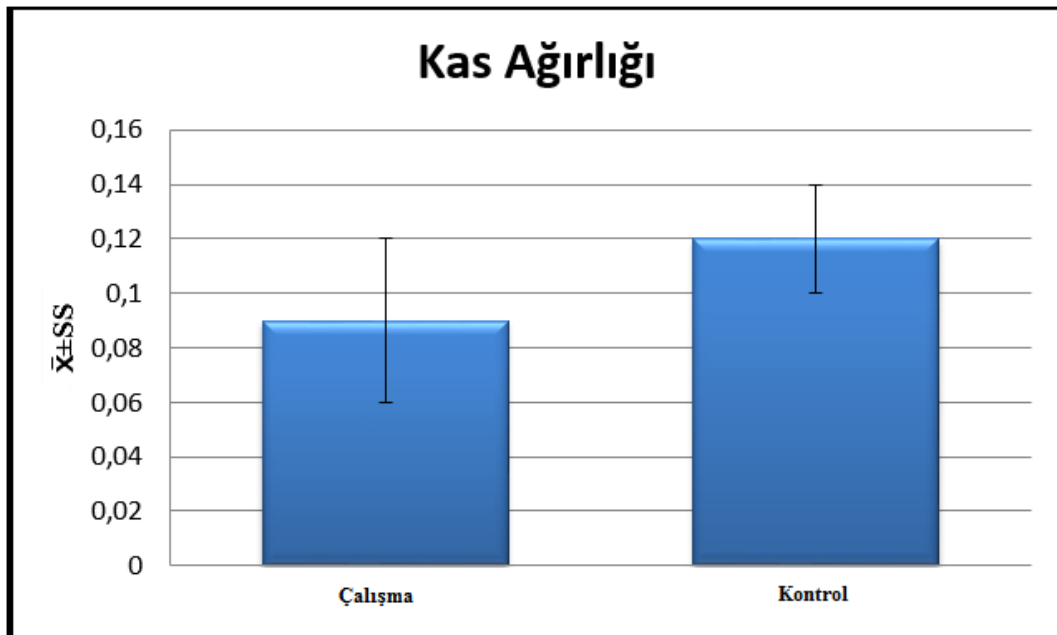
Çalışma grubunun ortalama sağ gastroknemius kas ağırlığı 0.09 ± 0.03 g olup, kontrol grubunda ise 0.12 ± 0.02 g olarak saptanmıştır. Çalışma grubunun sağ gastroknemius kas ağırlığı ortalaması, kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.4 ve Grafik 4.3).

Tablo 4.4 Grupların sağ gastroknemius kas ağırlıklarının ortalamaları

	Kas Ağırlığı (g)	
	$\bar{x} \pm SS$	p
Çalışma Grubu	0.09 ± 0.03	0.044*
Kontrol Grubu	0.12 ± 0.02	

¹Student t test

* $p < 0.05$



Grafik 4.3 Grupların kas ağırlığı ortalamalarının karşılaştırılması

4.3. mTOR ve Myogenin Düzeyleri

Çalışma ve kontrol gruplarının Eliza ile yapılmış olan analiz sonuçlarına göre mTOR ve myogenin düzeyleri sırası ile Tablo 4.5 ve Tablo 4.6' da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Grupların mTOR düzeyleri

Denekler	mTOR (ng/mL)					
	Çalışma Grubu			Kontrol Grubu		
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm
1	5.090	5.333	4.942	4.425	4.645	4.729
2	3.859	4.391	4.266	3.556	4.488	4.641
3	3.887	4.535	4.438	4.765	4.961	5.352
4	4.504	4.469	4.438	4.438	4.272	4.494
5	4.050	3.875	5.518	4.543	5.114	5.142
6	3.445	3.865	4.948	6.340	4.510	3.787
7	3.381	4.328	4.798	5.354	3.793	3.853

Tablo 4.6 Grupların myogenin düzeyleri

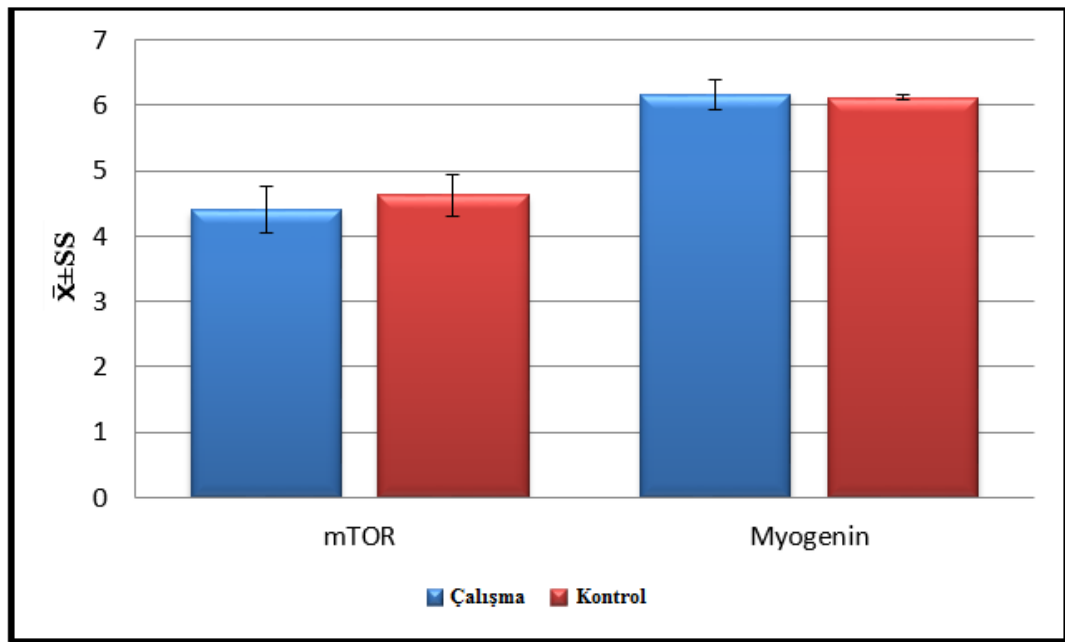
Denekler	Myogenin (ng/mL)					
	Çalışma Grubu			Kontrol Grubu		
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm
1	6.758	6.767	6.540	6.120	6.108	6.132
2	6.093	6.103	6.055	6.098	6.139	6.103
3	6.021	6.061	6.065	6.178	6.076	6.123
4	6.035	6.114	6.054	6.234	6.145	6.109
5	6.108	6.168	6.089	6.067	6.087	6.074
6	6.087	6.093	6.060	6.208	6.123	6.142
7	6.126	6.154	6.094	6.118	6.029	6.055

Gruplar mTOR ve myogenin düzeylerinin ortalamaları açısından karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır (sırası ile $p=0.227$ ve $p=0.548$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 Grupların mTOR ve myogenin düzeyleri açısından değerlendirilmesi

	Çalışma	Kontrol	p
	$\bar{x}\pm SS$	$\bar{x}\pm SS$	
mTOR (ng/mL)	4.40±0.35	4.63±0.32	0.227
Myogenin(ng/mL)	6.17±0.23	6.12±0.04	0.548

Student t test



Grafik 4.4 mTOR ve myogenin ortalamalarının karşılaştırılması

Gruplar arasında mTOR ve myogenin ortalamaları açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($p > 0.05$) (Grafik 4.4). Çalışma grubunda mTOR düzeyi ile 7. gün ağırlığı ve kas ağırlığı arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$). Yine çalışma grubunda myogenin düzeyi ile 7. gün ağırlığı ve kas ağırlığı arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Çalışma grubunda mTOR ve myogenin düzeyleri ile son ağırlık ve kas ağırlığı ilişkisi

Çalışma Grubu	mTOR		Myogenin	
	r	p	r	p
7.gün ağırlığı	-0.075	0.873	-0.038	0.935
Kas ağırlığı	-0.364	0.422	-0.107	0.819

Pearson korelasyon analizi

Tablo 4.9 Kontrol grubunda mTOR ve myogenin düzeyleri ile son ağırlık ve kas ağırlığı ilişkisi

Kontrol Grubu	mTOR		Myogenin	
	r	p	r	p
7.gün ağırlığı	0.074	0.875	-0.123	0.793
Kas ağırlığı	0.123	0.794	-0.183	0.694

Pearson korelasyon analizi

Tablo 4.9’da kontrol grubunda mTOR ve myogenin düzeyleri ile son ağırlık ve kas ilişkisi verilmiştir. Kontrol grubunda mTOR düzeyi ile 7. gün ağırlığı ve kas ağırlığı arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). Yine kontrol grubunda myogenin düzeyi ile 7. gün ağırlığı ve kas ağırlığı arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki belirlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.9).

5. TARTIŞMA

Obezite, tüm dünyada en yaygın hastalık olmakla birlikte birçok kronik hastalık için de risk faktörüdür. Ancak ciddi yan etkiler yaratmaksızın vücut ağırlığını azaltacak herhangi bir terapotik ajan bulunmamaktadır (109). Enerji kısıtlaması obezitenin tedavisindeki en temel yaklaşım olduğundan, son yıllarda enerji kısıtlamasının faydalı etkilerini taklit edebilecek ve obezite tedavisinde kullanılabilen doğal ya da sentetik bileşiklerin tanımlanmasına odaklanılmıştır (41).

Resveratrolün, adipoz doku kütlesini azalttığı hayvan modelinde gösterilmiştir (110,111). Resveratrolün anti-obezite mekanizması tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte, adipogenez, apoptoz, lipogenez, lipoliz, termogenez ve yağ asit oksidasyonu gibi çeşitli metabolik yollara olan etkisi üzerinde durulmaktadır (42). Li ve arkadaşları (112), resveratrolün adipojenik farklılaşma üzerine olan etkilerini, murine 3T3-L1 hücreleri ve insan SGBS (Simpson-Galabi- Behmel-Sendrom) hücrelerinde çalışmış ve resveratrolün, adipositlerde lipogenez baskıladığını hem insan, hem de hayvan hücrelerinde göstermişlerdir. Çalışmada, resveratrolün anti-lipojenik etkisinin asetil CoA karboksilaz (ACC) inhibisyonu ve mitokondriyal biyogenez seviyelerindeki artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise, OLETF ratların diyetlerine resveratrol ilave ederek anti-obezite etkileri araştırılmış ve resveratrol müdahalesi ile yağ metabolizmasında anlamlı azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir (40). Bu çalışmayı destekler şekilde, yine obez hayvanlarda resveratrolün beyaz yağ dokusundaki anti-adipojenik ve anti-inflamatuvar etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerle kıyaslandığında, %0.4 resveratrol içeren diyet ile beslenen farelerde ağırlık kaybı anlamlı bulunmuştur (-%48) (43). Yapılan bir çalışmada, resveratrolün ağırlık kazanımı üzerine olan etkisini, enerji alımını azaltarak, dinlenme metabolik hızını ve yağ mobilizasyonunu arttırarak yaptığı vurgulanmıştır (50). Chang ve arkadaşlarının (113), yapmış olduğu çalışmada da; resveratrolün yüksek yağlı diyet ile obez yapılmış

farelerde; 1-30 mg/kg resveratrol uygulamasının, enerji alımında bir azaltma yaratmaksızın, doza bağımlı olarak ağırlık kaybına neden olduğu bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada da resveratrol alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir ağırlık kaybı gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Ancak resveratrolün ağırlık kontrolünde etkisiz olduğuda raporlanmıştır. Sağlıklı 24 obez erkek birey üzerinde yapılmış olan bir çalışmada yüksek doz resveratrol uygulaması (1500 mg/gün) öncesi ve sonrasında ektopik (karaciğer ve iskelet kası) ve viseral yağ içeriği, magnetik rezonans ve spektroskopi ile ölçülerek karşılaştırılmış ve parametrelerin hiç birinin yüksek doz resveratrol uygulamasından etkilenmediği gözlemlenmiştir (49). Başka bir çalışmada da, C57B1/6J farelerde enerji kısıtlaması ile birlikte kilogram başına 2 ila 4 gram resveratrol içeren yem ile beslemenin, enerji alımı, metabolik performans, inflamatuvar genler ve SIRT proteinlerinin ekspresyonuna olan etkileri incelenmiş, sonuçta ne düşük doz, ne de yüksek doz resveratrol müdahalesinin enerji alımına, ağırlık kazanımına, vücut yağ yüzdesine ne de metabolik performans üzerine herhangi bir etki yaratmadığı vurgulanmıştır (114). Başka bir çalışmada ise obez farelerde, göreceli düşük doz resveratrol uygulamasının açlık kan şekeri ve insülin düzeylerini azalttığı, ancak vücut ağırlığı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir (115).

Resveratrolün ağırlık kaybı üzerine etkisinde tartışmalı bir başka konu ise, resveratrolün ağırlık kaybına olan etkisinin obez olmayan insanlarda görülmemesi nedeniyle yalnızca yüksek yağlı diyet ya da obez bireylerde mi etkili olduğu konusudur (112). Bu çalışmada obezite ya da yüksek yağlı diyetle beslenme modeli oluşturulmaksızın bu etkinin gösterilmesi önemlidir. Obezite tedavisinin, obezite meydana geldikten sonra zor ve tekrarlayan bir süreç olduğu düşünüldüğünde en etkili tedavinin obezitenin oluşumunu engellemek olduğu aşikardır. Bu bağlamda obezitenin gelişimini önlemede resveratrolün bu etkisinin daha net anlaşılabilmesi açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Başka bir tartışmalı nokta ise resveratrolün ağırlık kaybına neden olan etkin doz tartışmasıdır. Resveratrolün bu etkisinin, doza bağımlı olarak meydana geldiğini

belirten (48), bunun yanı sıra bu çalışmayı destekler bir şekilde düşük doz resveratrol uygulamasının, yüksek doz uygulamaya kıyasla adipoziteyi baskılamakta daha etkin olduğunu ve vücut ağırlığında anlamlı azalma sağladığını belirten çalışmalar mevcuttur (116,117).

Resveratrolün ağırlık kontrolü üzerindeki etki mekanizmalarından bir diğeri ise leptin salgısı üzerine olan etkisidir. Obezitede leptin direnci, üzerinde sıklıkla durulan mekanizmalardandır. Leptin, başlıca beyaz adipoz dokudan salgılanmaktadır ve besin alımını baskılayarak ve enerji harcamasını arttırarak enerji homeostazını düzenlemektedir. Ancak obezite durumunda leptine karşı yanıtın azalması ile hiperleptinemi bir arada bulunur. Bu olay leptin direnci olarak tanımlanmaktadır ve leptin duyarlılığının yeniden sağlanmasının obezitenin tedavisinde yararlı bir strateji olduğu düşünülmektedir. Çeşitli besin bileşenlerinin; teosaponinler, resveratrol, kafein, taurin gibi leptin sinyalizasyonunu nöronlarda anoreksijenik peptitlerin ekspresyonunu arttırarak ve/veya oreksijenik peptitlerin ekspresyonunu yeniden düzenleyerek besin alımını azaltabileceği belirtilmektedir (118). Resveratrolün leptin sekresyonu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, resveratrolün rat adipozitlerinde doza bağımlı olarak leptin salgısını baskıladığı ve adipozitler üzerinde endokrinolojik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (119). Bu çalışmada resveratrolün zayıflatıcı etkisi gösterilmiş olmakla birlikte, olası mekanizmalardan leptin ve adipozit doku üzerindeki etkilerini değerlendirebilecek herhangi bir parametre olmadığı için mevcut etkinin leptin salgısı üzerinden mi, yoksa diğer mekanizmalar üzerinden mi gerçekleşmiş olduğu bilinmemektedir.

Mammalian target of rapamycin (mTOR); fosfotidilinositol 3- kinaz (PI3K) ilişkili kinaz ailesine ait atipik serine/treonin protein kinazdır. mTOR yolağı en az beş majör intraselüler ve ekstraselüler uyarıları (büyüme faktörleri, stres, enerji durumu, oksijen ve aminoasitler gibi) birleştirerek birçok süreci (protein ve lipit sentezi ve otofaji gibi) kontrol eder (120). mTOR büyüme sinyalleri ve beslenme durumunda, protein sentez regülasyonunu etkiler. İnsan vücudundaki en büyük protein deposu iskelet kasları olduğundan, iskelet kas fenotipinin belirlenmesinde mTOR merkezi rol oynamaktadır. mTOR miyofibriller protein sentezi için de gereklidir (121).

İskelet kas kütlesinde artmış mekanik yüklenmeye yanıt olarak oluşan hipertrofi ve protein sentezindeki artış için mTOR sinyalizasyonu gereklidir (122). Ancak, mTOR sinyalizasyonunun azalmış mekanik yüklenme süresince protein sentezi ve kas kütlesinin regülasyonu üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; immobilizasyon sürecinde beklendiği gibi protein sentez hızını ve kas kütlesini azaltmıştır. İlginç olarak immobilizasyonda mTOR sinyalizasyonu da artmıştır. İmmobilizasyon durumunda rapamycin ile mTOR blokasyonu gerçekleştirildiğinde ise, protein sentezi ve kas kütlesindeki kayıp daha da artmaktadır. Bu nedenle mTOR aktivasyonunun immobilizasyon süresince oluşan protein sentezi ve kas kütlesindeki azalmayı değiştirmek için gerekli olduğu belirtilmiş ve kas atrofilerinin önlenmesinde mTOR aktivasyonu hedef terapi olarak vurgulanmıştır (123).

Resveratrolün protein degradasyonunu engellediği çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (9,10). Resveratrolün anti-kaşektik etkisini NFkB aktivitesini ve MuRF1 ekspresyonunu inhibe ederek yaptığı belirtilmiştir (76). Resveratrolün, TNF- α ile indüklenen atrofilerde, Akt, p70S6K, mTOR ve 4E-BP1 fosforilasyonunu arttırarak, kas korunumu sağladığı belirtilmektedir (11). Alamdari ve arkadaşlarının (77) yaptığı çalışmada, resveratrolün deksametazon ile indüklenerek gerçekleştirilmiş MAFbx ve MuRF1 ekspresyonunun katabolik etkilerine karşı önleyici olduğu ve bunu SIRT1' e bağlı olarak yaptığı bildirilmiştir. Buna karşın resveratrolün kas kütlesi kayıplarını bloke edemeyeceği ya da geri çeviremeyeceği de belirtilmektedir (75).

Bu çalışmada ise, kontrol grubu ile çalışma grubunun kas ağırlıkları karşılaştırıldığında, resveratrol alan grupta kas ağırlığında istatistiksel olarak önemli azalma saptanmış ($p < 0.05$) ve resveratrolün kas kaybının korunmasında herhangi bir önleyici etkisi bulunmamıştır. Resveratrolün atrofi modellerindeki olumlu etkileri göz önünde alındığında, belki de resveratrolün kas atrofisinde önleyici değil tedavi edici bir rolü olduğu düşünülebilir. Bu çalışmada da herhangi bir atrofi modeli yaratılmadığı için resveratrolün bu etkisini gözlemlenememiş olabilir. Literatürde atrofi sürecinde genel olarak mTOR yolağının down-regüle olduğu, nadir olarak ise up-regüle olabileceği gösterilsede tüm bu bilgilerle çelişir şekilde bu çalışmada atrofiye rağmen mTOR düzeyleri sabit kalmıştır.

Kas hipertrofisinde Akt/mTOR ve kalsinörin /NFAT yolağı en temel sinyalizasyon yolakları olarak gösterilmektedir. Akt/mTOR yolağı hipertrofi süresince up-regüle olurken, atrofi sürecinde down-regüle olmaktadır (81). Kas prekürsör (MPC) hücre proliferasyonu iskelet kas büyümesinin düzenlenmesi, sürdürülmesi, tamiri ve yaşa bağımlı kas kütlesi kayıplarında önemlidir. Yetişkin iskelet kası kök hücresi ya da kas prekürsör hücreleri neredeyse tek başına iskelet kas fibrillerinin rejenerasyonundan ve boyutlarındaki artıştan sorumludurlar (124). Yapılan bir çalışmada SIRT1' in kas prekürsör hücrelerinin farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (125). Ancak bununla çelişir bir şekilde, Rathbone ve arkadaşları (124) ise, literatürde ilk kez SIRT1' in kas prekürsör hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını belirtmişlerdir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, SIRT1 aktivatörlerinden biri olan resveratrolün iskelet kas hücreleri üzerindeki atrofi ya da protein sentezi üzerine olan etkileri tartışmalıdır. İskelet kası büyüme ve protein sentezinde, SIRT1 ve SIRT6, IGF-1 ve Akt/mTOR sinyalizasyonlarının negatif düzenleyicisi olarak vurgulandığı bir çalışmada, yaşa bağılı olarak katabolik ya da besin ögesi kısıtlamasına bağılı SIRT1' deki herhangi bir değişiklik, potansiyel olarak mTOR fonksiyonunu etkileyebilir ve rejenerasyonda değişiklik ile sonuçlanabilir. Tüm bu veriler SIRT1' in; iskelet kas kütlesindeki artışla ilişkili olan Akt/mTOR gibi yolaklardaki potansiyel negatif regülasyonunu işaret etmektedir (126). Son zamanlarda ise resveratrolün SIRT1'den bağımsız bir mekanizma ile mTOR sinyalizasyonunu, bunun da protein sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (127). Bu verilerin aksine yapılan başka bir çalışmada ise, 3 haftalık resveratrol suplementasyonu ile kaspaz-9 düzeylerinde azalma ve hindlibm suspension (uyluktan asma deneysel atrofi modeli) sonrasında gastroknemius kasında Bcl-2 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu veriler, immobilizasyona sekonder gelişen kas gücü kaybının engellenmesinde önemli bir adaptasyon olarak vurgulanmıştır (128). Yine başka bir çalışmada ise, SIRT1 ve SIRT2' nin p70S6K' nin asetilasyonunu bloke ettiği, kardiyak kaslarda, SIRT1' in çeşitli yolaklarda Akt fosforilasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (126). Tüm bu çelişkili veriler ışığında SIRT1 aktivasyonunun özellikle de iskelet kas doku ve hücrelerinde ekspresyonunu artırıcı resveratrol ya da başka bir

analoğu tarafından suplemantasyonunun iskelet kas kütlesi regülasyonunda pozitif ya da negatif etki gösterip göstermediğinin çok daha fazla araştırılmaya ihtiyacı vardır (126). Bu çalışmada ise SIRT1 aktivasyonuna bakılmamış olmakla birlikte resveratrolün SIRT1 aktivatörü olarak kesin kabul görmesi nedeniyle, resveratrol ile sağlanan SIRT1 aktivasyonunun, literatürdeki mTOR düzeyleri üzerine arttırıcı ya da azaltıcı sonuçlarına rağmen, mevcut çalışmanın sonucunda literatürün aksine resveratrol müdahalesinin mTOR düzeyleri üzerine etkisi bulunmamış, mTOR düzeyleri sabit kalmıştır. Bu sonuç resveratrolün mTOR düzeylerine SIRT1'den bağımsız yollar üzerinden etkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Resveratrolün kas hipertrofisi ve atrofisi üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmaya göre; C2C12 miyotübülleri resveratrol varlığında ve yokluğunda TNF- α maruziyetine bırakılmıştır. TNF- α ile müdahale edilen miyotübüllerde kas spesifik ubiquitin ligaz MAFbx ve MuRF1'lerde hiperekspresyon ve bu değişiklikler ile bağlantılı olarak anabolik hedeflerde (Akt, mTOR, p70S6K ve 4E-BP1) azalma ve katabolik hedeflerde (FOXO1, FOXO3a, MAFbx, MuRF1) artış gözlemlenmiştir. Resveratrol ile müdahale, TNF- α 'nın indüklediği protein kaybını önlemiş ve Akt, mTOR, p70S6K ve 4E-BP1 ekspresyonlarındaki azalmayı geriye çevirmiştir. Çalışmanın sonucunda resveratrol uygulanan miyotübüllerde hipertrofik görüntü ve miyotübül diamlrelerinde artış saptanmıştır. Resveratrolün, sadece TNF- α 'nın indüklediği atrofik yanıtı baskılamakla kalmayıp, miyotübüllerdeki hipertrofik yolları da indüklediği, miyotübül hipertrofisinin Akt/mTOR yolağının aktivitesine bağlı olduğu, bu yolağın resveratrol tarafından regüle edildiği, bu nedenle de kas kütlesinin geliştirilmesinde önemli bir strateji olabileceği öne sürülmüştür (11). İskelet kas lifleri hızlı ve yavaş kasılan tipler olmak üzere genel olarak iki kategoride toplanmaktadır. Tip 1 diyabetes mellitusta (T1DM) yavaş tip miyofiber büyüklüğünde ve protein sentezinde azalma olduğu kanıtlanmıştır (129). Diyabetik farelerin SOL (soleus) ve EDL (ekstensor digitorum longus) kaslarındaki fosforolize olmuş Akt seviyesi diyabetik olmayan farelere kıyaslandığında anlamlı düşüktür. Resveratrol suplemantasyonu ile diyabetik farelerin SOL kas dokusunda Akt fosforilasyonu artmış, EDL kasında da istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç

bize resveratrolün, T1DM' llerde yavaş tipte kaslarda Akt yolağı üzerinden bir etkisi olduğuna işaret etmektedir (129). Benzer şekilde başka bir çalışmada; diyabette hızlı ve yavaş kaslardaki azalmış olan Akt ve GSK3 fosforilasyonu resveratrol müdahalesi ile tersine çevrilmiştir (130). Ancak saptanan Akt artışına rağmen resveratrol ile müdahale edilen ve edilmeyen diyabetik farelerin EDL ve SOL kas dokularında mTOR fosforilasyonu oranlarında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (129). Resveratrolün diyabetik farelerde kas dokusu üzerine etkisinin incelendiğı çalışmaya benzer olarak, bu çalışmada da resveratrol uygulamasının mTOR düzeyleri üzerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

Yapılan başka bir çalışmada ise, 6 haftalık güç egzersizi sonrasında gerçekleşen iskelet kas kütleindeki artış, direkt olarak p70S6K1 (p70S6K1, mTOR' un direkt hedefidir) fosforilasyonu ile ilişki bulunmuştur. Çalışmada mTOR' un güç egzersizi sonrasındaki aktivasyonu ile genç bireylerde miyofibriller protein sentezindeki akut aktivasyonun korelasyon gösterdiği raporlanmıştır. Ancak bu çalışmada mTOR düzeylerinde değişiklik olmaksızın atrofi gözlemlenmiş ve bu sonuç da kas kütlesi üzerinde kritik öneme sahip IGF-1/PI3K/Akt/mTOR yolağından başka mekanizmaların da kas atrofisi ve hipertrofisinde önemli olduğunu göstermiştir (131).

Resveratrolün sağlık üzerine birçok olumlu etkisi gösterilmiş olmasına rağmen, iskelet kaslarına yönelik faydalı etkileri literatürde diğer dokulara kıyasla daha az incelenmiştir. Resveratrolün protein katabolizması ve kas fonksiyonlarını değiştirdiğı (99) ve iskelet kas hücre farklılaşmasında aktif rolü olduğu öne sürülmektedir (12). Ancak miyogenez sürecindeki hedef proteinler üzerine etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Resveratrol ile yapılan çalışma sonuçlarına göre resveratrolün bazı gen ekspresyonları ve mitokondriyal biyogenezi indüklediğı (63), ön farklılaşma ajanı gibi davrandığı, kastaki ön farklılaşma göstergeleri ve transkripsiyonel faktörleri (myogenin, Scrp3) up-regüle ettiği, miyozin ağır zincir içeriğini güçlü bir şekilde artırdığı gösterilmiştir (100). *In vitro* olarak C2C12 hücreleri, resveratrol ile müdahale edilerek hücrelerde meydana gelen morfolojik ve transkripsiyonel faktör proteinlerin miktarlarının incelendiğı bir çalışmada ise; resveratrol ile müdahale sonrasında Myf-5 ve MyoD protein düzeylerinde önemli artış

saptanmıştır. Bu sonuç, resveratrolün farklılaşmayı indükleyebileceğinin göstergesi olarak belirtilmiş ve resveratrol ile müdahalede miyozin ağır zincir protein ekspresyonlarının tüm farklılaşma basamaklarında arttığı vurgulanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre resveratrol; MRF'lerin (Myf-5, MyoD ve myogenin gibi) erken ekspresyonunu, kas gösterge proteinleri (miyozin ağır zincir) ve iskelet yapısal protein süreçlerini teşvik ettiği ve IGF-1 yolağını stimüle ederek hipertrofi üzerine pozitif etki gösterdiği vurgulanmıştır. Bu çalışma sonucunda, resveratrolün miyogenez ve hipertrofiyi *in vitro* olarak kontrol edebileceği belirtilmiştir (12). Ancak bununla çelişir şekilde C2C12 (aktive edilmiş satellite hücre *in vitro* modeli) fare hücrelerinde SIRT1' in myoblast farklılaşmasını inhibe ettiği, satellite hücre farklılaşmasında önemli regülatör olan myogenin ekspresyonunu azalttığı bildirilmektedir (125). *In vitro* modellerde gösterilen ve kas hastalıklarının tedavilerinde, bunun yanı sıra sporcularda performans artışı ve ergojenik yardım olarak yeni bir umut ışığı olan resveratrolün bu etkisinin *in vivo* modelde de varlığını saptayabilmek amacı ile yapılan bu çalışmada resveratrolün myogenin üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Bu çalışma; her biri 7 fareden oluşacak şekilde çalışma grubu (resveratrol uygulamasının yapıldığı grup) ve kontrol grubu (uygulama yapılmayan grup) olmak üzere toplam 14 Swiss Albino erkek farede yapılmıştır. Çalışma grubuna ardışık 7 gün boyunca saat 10.00' da 20 mg/kg/gün trans-resveratrol intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile uygulanmış ve resveratrol müdahalesinin vücut ağırlığı, gastroknemius kas ağırlığı, mTOR ve myogenin düzeyleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma ile elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

1. Resveratrol uygulaması ile çalışma grubunun vücut ağırlığında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma saptanmıştır ($p<0.05$).
2. Çalışma grubunda 1. gün ağırlığına göre 7. gün ağırlığında düşüş saptanmış ve bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$), kontrol grubunda ise 1. gün ağırlığına göre 7. gün ağırlığında artış saptanmış ancak bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).
3. Çalışma grubunda sağ gastroknemius kas ağırlığı, kontrol grubunun sağ gastroknemius kas ağırlığına göre istatistiksel açıdan önemli düşük bulunmuştur ($p<0.05$).
4. Çalışma ve kontrol grupları arasında mTOR ve myogenin düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).
5. Çalışma grubunda 7. gün ağırlığı ve kas ağırlıklarına göre mTOR ve myogenin düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

6. Kontrol grubunda 7. gün ağırlığı ve kas ağırlıklarına göre mTOR ve myogenin düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

6.2. Öneriler

Obezite modeli ya da yüksek yağlı diyet olmaksızın standart yem ile *ad libitum* beslenmede farelerde resveratrol uygulaması ile ağırlık kaybının gözlemlenmesi önemli bir sonuçtur. Obezite geliştikten sonra tedavisi zor ve uzun süreli bir süreçtir ve genel olarak tedavisi sonrası nüks oranı yüksektir. Resveratrol obezitenin önlenmesinde biyoaktif bir bileşen olarak ortaya konulmuştur.

Literatür bilgileri ışığında kas atrofisinde mTOR düzeylerinde genel olarak azalma saptandığı bildirilmektedir, ancak bu çalışmada mTOR düzeylerinde herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Kas atrofisine rağmen bu etkinin saptanmamış olması resveratrolün burada farklı bir mekanizma ile mTOR düzeylerini sabit tutmuş olabileceği ve kas atrofisinde başlıca mekanizma olan gösterilen Akt/mTOR yolağından farklı yolların üzerinde de durulması gerektiğini göstermiştir.

In vitro çalışmalarda resveratrol müdahalesi ile myogenin düzeylerinde saptanan artış ve bunun kas korunumu, geliştirilmesindeki etkisi *in vivo* olarak yürütülen bu çalışmada saptanmamıştır. Bu sonucun, uygulanan doz, süre ve olası başka mekanizmaların etkisinden kaynaklanabileceği gösterilmiştir.

Resveratrolün olası metabolik etkilerini ortaya koyabilmek adına daha fazla denek ve farklı dozların uygulandığı *in vivo* çalışmalara ihtiyaç olduğunu kanımsındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Clapier VR. Potentiating exercise training with resveratrol. *J Physiol* 590 (14): 3215-3216, 2012.
2. Wang J, Jiang FY. Natural compounds as anticancer agents: experimental evidence. *World J Exp Med* 20: 45-57, 2012.
3. Saldanha FJ, Leal OV, Stenvinkel P, et al. Resveratrol : why is it a promising therapy for chronic kidney disease patients?. *Oxid Med Cell Longev* 963217-6, 2013.
4. Sales MF, Resurreccion AVA. Resveratrol in peanuts. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54: 732-770, 2014.
5. Keskin N, Noyan T, Kunter B. Resveratrol ile üzümden gelen sağlık. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 29: 1273-1279, 2009.
6. Smoliga MJ, Baur AJ, Hausenblas AH. Resveratrol and health- a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 55: 1-13, 2011.
7. Widlund AL, Baur JA, Vang O. mTOR: more targets of resveratrol?. *Expert Rev Mol Med* 15: 10-25, 2013.
8. Schindler JP, Summermatter S, Santos G, et al. The transcriptional coactivator PGC-1 α is dispensable for chronic overload- induced skeletal muscle hypertrophy and metabolic remodeling. *PNAS* 110 (50); 20314-20319, 2013.
9. Russell ST, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanism of induction of muscle protein degradation by angiotensin II. *Cell Signal* 18:1087-1096, 2006.
10. Wyke SM, Tisdale MJ. Induction of protein degradation in skeletal muscle by a phorbol ester involves upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Life Sci* 78: 2898-2910, 2006.
11. Wang DT, Ying Y, Yang YJ, et al. Resveratrol prevents TNF- α - induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. *Int Immunopharmacol* 19(2): 206, 2014.
12. Montesano A, Luzi L, Senesi P, et al. Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts. *J Transl Med* 11: 310, 2013.
13. Park CE, Kim MJ, Lee JH, et al. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mol Med* 39(2): 222-229, 2007.
14. Rege SD, Geetha T, Griffin GD, et al. Neuroprotective effect of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front Aging Neurosci* 6: 1-12, 2014.
15. Cottart HC, Antoine NV, Beaudoux LJ. Review of recent data on the metabolism, biological effects and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res* 58: 7-21, 2014.
16. Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, et al. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res* 70(22):9003-11, 2010.

17. Chow HH, Garland LL, Hsu CH, et al. Resveratrol modulates drug and carcinogen- metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res* 3: 1168-1175, 2010.
18. Heeboll S, Thomsen LK, Pedersen BS, et al. Effect of resveratrol in experimental and clinical non- alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 27: 188-198, 2014.
19. Çolak Y, Öztürk O, Senates E, et al. SIRT 1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit* 17(5): 5-9, 2011.
20. Ajmo MJ, Liang X, Roger QC, et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295: 833-842, 2008.
21. Xiao J, So FK, Liang CE, et al. Recent advances in the herbal treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Tradit Complement Med* 3(2): 88-94, 2013.
22. Andrade JM, Paraiso AF, Oliveira MV, et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition* 30: 915-9, 2014.
23. Bujanda L, Hijona D, Larzabal M, et al. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol* 8: 40-8, 2008.
24. Shang J, Chen LL, Xiao FX. Resveratrol improves high-fat induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 16(8): 616-9, 2008.
25. Shang J, Chen LL, Xiao FX, et al. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activatin AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin* 29 (6): 698-706, 2008.
26. Zorita SG, Quintela AF, Macarulla MT, et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr* 107(2): 202-210, 2012.
27. Chachay VS, Macdonald GA, Martin JH, et al. Resveratrol does not benefit patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12(12): 1-6, 2014.
28. Hosseini A, Ghorbani A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *AJP* 5(2): 84-97, 2015.
29. Hajzadeh MR, Tavakkol- Afshari J, Ghorbani A, et al. The effects of aqueous extract of garlic (*allium sativum* L.) on laryngeal cancer cells (Hep-2) an L929 cells in vitro. *J Med Plants* 5: 41-48, 2006.
30. Mortazavian SM, Ghorbani A, Hesari TG. Effect of hydro-alcoholic extract of *viola tricolor* and its fractions on proliferation of uterine cervix carcinoma cells. *Iran J Obst Gynecol Infertil* 15: 9-16, 2012.
31. Tavakkol-Afshari J, Hajzadeh MR, Ghorbani A, et al 2006. Ethanoic extract of *allium sativum* has antiproliferative effect on Hep 2 and L929 cells. *Pharmacogn Mag* 2: 29-31, 2006.
32. Yuan L, Zhang Y, Xia J, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest via a p53-independent pathway in A549 cells. *Mol Med Rep* 11(4): 2459-2464, 2015.

33. Shrotriya S, Agarwal R, Sclafani RA. A perspective on chemoprevention by resveratrol in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol* 815: 333-48, 2015.
34. Chin TY, Hsieh TM, Yang HS, et al. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro. *Oncotarget* 5(24): 12891-907, 2014.
35. Phuah HN, Nagoor HN. Regulation of micro RNAs by natural agents: new strategies in cancer therapies. *BioMed Res Int* 1-17, 2014.
36. Khan A, Aljarbou AN, Aldebasi YH, et al. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. *Cancer Epidemiol* 38(6): 765-72, 2014.
37. Osman AM, Al-Malki HS, Al-Harathi SE, et al. Modulatory role of resveratrol on cytotoxic activity of cisplatin, sensitization and modification of cisplatin resistance in colorectal cancer cells. *Mol Med Rep* 12(1): 1368-74, 2015.
38. Harati K, Slodnik P, Chromik AM, et al. Resveratrol induces apoptosis and alters gene expression in human fibrosarcoma cells. *Anticancer Res* 35(2): 767-74, 2015.
39. Lin Y, Ynqve A, Lagergen J, et al. A dietary pattern rich in lignans, quercetin and resveratrol decreases the risk of oesophageal cancer. *Br J Nutr* 112(12): 2002-9, 2014.
40. Martin SL, Hardy TM, Tollefsbol TO. Medicinal chemistry of the epigenetic diet and caloric restriction. *Curr Med Chem* 20(32): 4050–4059, 2013.
41. Alberdi G, Macarulla MT, Portillo MM, et al. Resveratrol does not increase body fat loss induced by energy restriction. *J Physiol Biochem* 70(2): 639-46, 2014.
42. Aguirre L, Quintela A.F, Arias N, et al. Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules* 19: 18632-18655, 2014.
43. Kim S, Jin Y, Choi Y, et al. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol* 81(11): 1343–1351, 2011.
44. Chen S, Li Z, Li W, et al. Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. *Can J Physiol Pharmacol* 89: 793–799, 2011.
45. Chen S, Xiao X, Feng X, et al. Resveratrol induces Sirt1-dependent apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes by activating AMPK and suppressing AKT activity and survivin expression. *J Nutr Biochem* 23: 1100–1012, 2012.
46. Kang NE, Ha AW, Kim JY, et al. Resveratrol inhibits the protein expression of transcription factors related adipocyte differentiation and the activity of matrix metalloproteinase in Mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes. *Nutr Res Pract* 6: 499–504, 2012.
47. Rayalam S, Yang JY, Ambati S, et al. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 22: 1367–1371, 2008.
48. Wang S, Moussa NM, Chen L, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem* 25(1): 1–18, 2014.

49. Timmers S, Hesselink MK, Schrauwen P. Therapeutic potential of resveratrol in obesity and type 2 diabetes: new avenues for health benefits?. *Ann N Y Acad Sci* 1290: 83–89, 2013.
50. Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol* 10: 11,2010.
51. Csiszar A, Labinskyy N, Pinto TJ, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(1): 13-20, 2009.
52. Norrbom J. Exercise and regulation of mitochondrial biogenesis factors in human skeletal muscle. Thesis for doctoral degree, Karolinska Institute, Stockholm, 2008.
53. Lluch LG, Irusta MP, Navas P, et al. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 43(9): 813-819, 2008.
54. Dolinsky VW, Dyck JRB. Experimental studies of the molecular pathways regulated by exercise and resveratrol in heart, skeletal muscle and the vasculature. *Molecules* 19: 14919-14947, 2014.
55. Ergen E, Demirel H, Güner R, Turnagöl H, Başoğlu S, Zergeroğlu AM, Ülkar B, Hazır T. İskelet kasları ve egzersiz. *Egzersiz Fizyolojisi Ders Kitabı* (Ergen E, ed). Üçüncü baskı. Ankara. Nobel, 1-23, 2011.
56. Dorfman L. Nutrition in exercise and sports performance. *Krause's Food and the Nutrition Care Process* (Mahan LK, Stump SE, Raymond JL, ed). Thirteenth edition. Missouri. Elsevier. 507-531. 2012.
57. http://www.taf.gov.tr/files/Genel_At%C4%B1c%C4%B11%C4%B1k_52.pdf
58. Schrauwen P, Timmers S. Can resveratrol help to maintain metabolic health. *Proc Nutr Soc* 73(2): 271-277, 2014.
59. Menzies KJ, Singh K, Saleem A, et al. Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 288(10): 6968-79, 2013.
60. Dolinsky WV, Jones EK, Sidhu SR, et al. Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *J Physiol* 590(11): 2783-2799, 2012.
61. Wu ER, Huang CW, Liao CC, et al. Resveratrol protects against physical fatigue and improves exercise performance in mice. *Molecules* 18: 4689-4702, 2013.
62. Murase T, Haramizu S, Ota N, et al. Suppression of the aging- associated decline in physical performance by a combination of resveratrol intake and habitual exercise in senescence- accelerated mice. *Biogerontology* 10(4): 423-34, 2009.
63. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127(6): 1109-22, 2006.
64. İşlekel H. Doku özel metabolizmaları. *İnsan Biyokimyası* (Onat T, Emerk K, Sözmén EY, ed). İkinci baskı. Ankara. Palme Yayıncılık, 609-616. 2006.

65. Yusuf F, Saberi BB. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol* 138: 187-199, 2012.
66. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Kas. Vander İnsan Fizyolojisi* (Demirgören S, ed). Onuncu baskı. İzmir. Güven Bilimsel, 279-323. 2010.
67. Günay M, Tamer K, Cicioğlu İ. *Kaslar ve egzersiz. Spor Fizyolojisi ve Performans Ölçümü* (Cicioğlu İ, ed). Üçüncü baskı. Ankara. Gazi Kitabevi, 91-131. 2013.
68. Ikeda Y, Imaob M, Satoh A, et al. Iron-induced skeletal muscle atrophy involves an Akt-forkhead box O3-E3 ubiquitin ligase-dependent pathway. *J Trace Elem Med Biol* 35: 66-76, 2016.
69. Lee D, Goldberg AL. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *J Biol Chem* 288(42): 30515-30526, 2013.
70. Marzetti E, Calvani R, Bernabei R, et al. Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty- a mini-review. *Gerontology* 58(2): 99-106, 2012.
71. Abrigo J, Rivera JC, Simon F, et al. Transforming growth factor type beta (TGF- β) requires reactive oxygen species to induce skeletal muscle atrophy. *Cell Signal* 28(5): 366-376, 2016.
72. Brooks NE, Myburgh KH. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. *Front Physiol* 17(5): 99, 2014.
73. Lai KMV, Gonzalez M, Poueymirou WT, et al. Conditional activation of Akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol* 24(21): 9295-9304, 2004.
74. Camporeza JPG, Petersena MC, Abudukadiera A, et al. Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(8): 2212-2217, 2016.
75. Dutt V, Gupta S, Dabur R, et al. Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action. *Pharmacol Res* 99: 86-100, 2015.
76. Wyke SM, Russel ST, Tisdale MJ. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* 91: 1742-1750, 2004.
77. Alamdari N, Aversa Z, Castellero E, et al. Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogen-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 417(1): 528-533, 2012.
78. Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci* 70(21): 4117-4130, 2013.
79. Hitachi K, Tsuchida K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front Physiol* 4: 1-7, 2014.
80. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 1974-84, 2005.

81. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3(11): 1014-9, 2001.
82. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(1): 59–68, 2014.
83. Schiaffinao S, Dyar AK, Ciciliot S, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 280(17): 4294-4314, 2013.
84. Erbay E, Park HI, Nuzzi DP, et al. IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *J C Biol* 163(5): 931-936, 2003.
85. Rodriguez J, Vemus B, Chelh I, et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 71(22): 4361-71, 2014.
86. Hudson MB, Price SR. Calcineurin: a poorly understood regulator of muscle mass. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2173–2178, 2013.
87. Korkmaz GS. Sporcularda uzun süreli yorgunluğun kas hasarıyla ilişkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana. 2010.
88. Bentzinger FC, Wang XY, Rudnicki AM. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(2): a008342, 2012.
89. Knight DR-J, Kothary R. The myogenic kinome: protein kinase critical to mammalian skeletal myogenesis. *Skelet Muscle* 1(29): 1-18, 2011.
90. Brown LD. Endocrine regulation of fetal skeletal muscle growth: impact on future metabolic health. *J Endocrinol* 221(2): 13-29, 2014.
91. Wood WM, Etemad S, Yamamoto M, et al. MyoD- expressing progenitors are essential for skeletal myogenesis and satellite cell development. *Dev Biol* 384(1): 114-127, 2013.
92. Hauerslev S, Vissing J, Krag TO. Muscle atrophy reversed by growth factor activation of satellite cells in a mouse muscle atrophy model. *Plos One* 9 (6): 100594, 2014.
93. Shen H, Lv Y, Shen XQ, et al. Implantation of muscle satellite cells overexpressing myogenin denervated muscle atrophy in rats. *Braz J Med Biol Res* 46(2): 5124-5130, 2016.
94. Sartorelli V, Caretti G. Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 15(5): 528-535, 2005.
95. Fu X, Zhao JX, Liang J, et al. AMP-activated protein kinase mediates myogenin expression and myogenesis via histone deacetylase 5. *Am J Physiol Cell Physiol* 305: 887-895, 2013.
96. Hsu LL, Zdanowic MM, Agarwal VR, et al. Expression of myogenic regulatory factors in normal and dystrophic mice: effect of IGF-1 treatment. *Biochem Mol Med* 60: 142-148. 1997.
97. Aguiar AF, Vechetti-Junior IJ, Alves de Souza RW, et al. Myogenin, MyoD and IGF-1 regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. *Int J Sports Med* 34(4): 293-301, 2013.

98. Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol* 5: 718-724. 1991.
99. Dirks Naylor AJ (2009). Cellular effects of resveratrol in skeletal muscle. *Life Sci* 84(20): 637-40, 2009.
100. Kaminski J, Lançon A, Aires V, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol* 84(10): 1251, 2012.
101. Atmaca N, Yıldırım E, Güner B, ve ark. Effect of resveratrol on hematological and biochemical alterations in rats exposed to fluoride. *Biomed Res Int* : 1-5, 2014.
102. Ara C, Karabulut AB, Kırımlıoğlu H, ve ark. Protective effect of resveratrol against renal oxidative stress in cholestasis. *Ren Fail* 27(4): 435-40, 2005.
103. Baker PKA, Stewart WG, Tomaszewski WH, et al. Implications of chronic daily anti-oxidant administration on the inflammatory response to intracortical microelectrodes. *J Neural Eng* 12(4): 046002, 2015.
104. Ara C, Kırımlıoğlu H, Karabulut AB, ve ark. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis. *J Surg Res* 127(2): 112-7, 2005.
105. Delucchi F, Berni R, Frati C, et al. Resveratrol treatment reduces cardiac progenitor cell dysfunction and prevents morpho-functional ventricular remodeling in type-1 diabetic rats. *Plos One* 7(6): 39836-48, 2012.
106. Huang W, Li G, Qui J, et al. The protective effects of resveratrol in experimental retinal detachment. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*. 54: 4198, 2013.
107. Sharma M, Briyal S, Gupta YK. Effect of alpha lipoic acid, melatonin and trans resveratrol on intracerebroventricular streptozotocin induced spatial memory deficit in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 49(4): 395-402, 2005.
108. Shi YJ, Seo AM, Choi JE, et al. Neuroprotective effects of resveratrol via anti-apoptosis on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Korean J Pediat* 51(10): 1102-1111, 2008.
109. Baek SH, Chung HJ, Lee HK, et al. Treatment of obesity with the resveratrol-enriched rice DJ-526. *Sci Rep* 4: 3879-85, 2014.
110. Alberdi G, Rodriguez VM, Miranda J, et al. Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr Metab* 8: 29, 2006.
111. Macarulla MT, Alberdi G, Gomez S, et al. Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem* 65: 369–376, 2009.
112. Li S, Bouzar C, Cottet-Rousselle C, et al. Resveratrol inhibits lipogenesis of 3T3-L1 and SGBS cells by inhibition of insulin signaling and mitochondrial mass increase. *Biochim Biophys Acta* 2016, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.009.
113. Chang CC, Lin KY, Peng KY, et al. Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Endocr J* 63(2): 169-78, 2016.

114. Tauriainen E, Luostarinen M, Martonen E, et al. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and fatty liver formation. *J Nutr Metab* :525094- 525104, 2011.
115. Leontieva OV, Paszkiewicz G, Demidenko ZN, et al. Resveratrol potentiates rapamycin to prevent hyperinsulinemia and obesity in male mice on high fat diet. *Cell Death Dis* 4: 472-8, 2013.
116. Cho SJ, Jung UJ, Choi MS. Differential effect of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 108(12): 2166-75, 2012.
117. Hu P, Zhao L, Chen J. Physiologically achievable doses of resveratrol enhance 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Eur J Nutr* 54(4): 569-79, 2015.
118. Aragonès G, Ardid-Ruiz A, Ibars M, et al. Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol Nutr Food Res* 2016, doi: 10.1002/mnfr.201500964.
119. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. The inhibitory effect of resveratrol on leptin secretion from rat adipocytes. *Eur J Clin Invest* 39(10): 899-905, 2009.
120. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2): 274-93, 2012.
121. Watson K, Baar K. mTOR and the health benefits of exercise. *Semin Cell Dev Biol* 36: 130-9, 2014.
122. Tsang CK, Qi H, Liu LF, et al. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 12 (3-4): 112-24, 2007.
123. You JS, Anderson GB, Dooley MS, et al. The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. *Dis Model Mech* 8(9): 1059-69, 2015.
124. Rathbone CR, Booth FW, Lees SJ. Sirt1 increases skeletal muscle precursor cell proliferation. *Eur J Cell Biol* 88(1): 35-44, 2009.
125. Alway SE, Myers MJ, Mohamed JS. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Front Aging Neurosci* 6: 246, 2014.
126. Sharples AP, Hughes DC, Deane CS, et al. Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. *Aging Cell* 14(4): 511-23, 2015.
127. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta* 852(6): 1114-23, 2015.
128. Jackson JR, Ryan MJ, Hao Y, et al. Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299 (6): 1572-81, 2010.
129. Chang CC, Yang MH, Tung HC, et al. Resveratrol exhibits differential protective effects on fast- and slow-twitch muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes* 6(1): 60-7, 2014.
130. Park EJ, Pezzuto JM. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim Biophys Acta* 1852(6): 1071-113, 2015.

- 131.**Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol* 276: 120–127, 1999.

8. EKLER

Ek 1 : Etik Kurul Onayı



1993

Başkent Üniversitesi

*Tıp ve Sağlık Bilimleri
Araştırma Kurulu*

Dr. Hakan Özkardeş
Dr. A. Eftal Yücel
Dr. Feride İ. Şahin
Dr. Şule Bulut
Dr. Fuat Büyüklü
Dr. Emine Aksoydan
Dr. Tolga R. Aydos
Dr. Elif Durukan
Dr. Şebnem İlhan

Başkent Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı
16. Sokak No. 11
Bahçelievler, 06490
Ankara

Tel : 0312 212 90 65
Faks : 0312 221 37 59
arastirma@baskent.edu.tr

Sayı: 94603339/18-050.01.08.01-709
Konu: Proje onayı

01/06/2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Sağlık Bilimleri Fakültesi / Beslenme ve Diyetetik Bölümünde görev yapmakta olan Prof. Dr. Gül Kızıltan tarafından yürütülecek olan DA15/25 nolu "Farelerde resveratrol ile beslenmenin myogenin ve mTOR düzeyleri üzerine etkisi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 11/05/2015 tarih ve 15/23 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayınlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma
Kurulu Başkanı

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Resarch on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

LT

İşlemlerinizi hızlandırmak için anabilim dalı üzerinden resmi yazışma ve imza gerektirmeyen her türlü bilgi alışverişinde arastirma@baskent.edu.tr e-posta adresimizi kullanınız (Bağlantı- Araştırma Kurulu Sekreteri: Lülifer Taşbilek).

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ



HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU KARARI

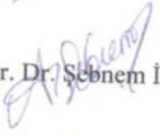
TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
11	15/23	11/05/2015

Sağlık Bilimleri Fakültesi / Beslenme ve Diyetetik Bölümünde görev yapmakta olan Prof. Dr. Gül Kızıltan tarafından yürütülecek olan DA15/25 nolu "Farelerde resveratrol ile beslenmenin myogenin ve mTOR düzeyleri üzerine etkisi" başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.


Prof. Dr. Hakan Özkardes


Prof. Dr. Ali Varan


Doç. Dr. Adnan Fuat Büyüklü


Öğr. Gör. Dr. Sebnem İlhan

Katılmadı.
İmdat Akmermer

Katılmadı.
Prof. Dr. A. Eftal Yücel


Prof. Dr. Feride Şahin


(Yrd). Doç. Dr. Tolga Reşat Aydos


Dr. Didem Bacanlı

ASLI GİBİDİR



Ek 2: Kimyasal Maddeler

Resveratrol (Burg-Apotheke)

mTor eliza kit (Mybiosource)

Myogenin eliza kit (Mybiosource)

Ketamin (Bremer Pharmacy)

Xylazine (Ata Fen)

Comassie brillant blue (Applichem, A3480)

BSA (bovine serum albumin-A3983 Sigma)

Distile su

Phosphate buffered saline (PBS tablet Sigma P4417)

Ek 3: Cihazlar

Mikro cerrahi mikroskobu (Zeiss)

Hassas tartı (sartorius)

Deney tüpleri (cam)

Ependorf tüp (1,5 ml)

Gilson pipet (1-10uL, 10-100uL, 100-1000uL skalasında)

Cam homojenizatör

Eliza Reader

Vortex V1 plus (Boeco)

Etüv Galaxy 48R

Epoch (spektrometre)

Soğutmalı santrifüj (Heraus Biofuge Stratos)