

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA NÖROMUSKULER ELEKTRİK STİMÜLASYONUNUN İSKELET
KASININ MİMARİ ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Fzt. Nehir UÇAR

Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA NÖROMUSKULER ELEKTRİK STİMÜLASYONUNUN İSKELET
KASININ MİMARİ ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Fzt. Nehir UÇAR

**Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Tüzün FIRAT**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan ÖNER**

**ANKARA
2023**

ONAY SAYFASI

SIÇANLARDA NÖROMUSKULER ELEKTRİK STİMÜLASYONUNUN İSKELET KASININ MİMARİ
ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Nehir Uçar

Danışman: Prof. Dr. Tüzün Fırat

İkinci Danışman: Prof. Dr. Hakan Öner

Bu tez çalışması 30.10.2023 tarihinde jürimiz tarafından "Fizik Tedavi ve
Rehabilitasyon Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Özlem Ülger*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Yaşar Gül Özkaya*
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Nevin Atalay Güzel*
(Gazi Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Melda Sağlam*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Gülcan Harput*
(Hacettepe Üniversitesi)

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

31 Ekim 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır. Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

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

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

03/10/2023

Uzm. Fzt. Nehir UÇAR

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

Uzm. Fzt. Nehir UÇAR

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezi çalışması, bir dizi kişinin büyük destekleri olmadan başarılamazdı. Bu nedenle, çalışmamın tamamlanmasına katkıda bulunan herkese teşekkür etmek isterim.

İlk olarak, tez danışmanım Prof. Dr. Tüzün Fırat'a, rehberliği ve değerli önerileri için minnettarlığımı sunarım. Sizlerin bilgeliği ve rehberliği, bu tezin daha iyi bir çalışma haline gelmesini sağladı.

İkinci danışmanım Prof. Dr. Hakan Öner'e, bu tez çalışmasının planlanması ve gerçekleştirilmesi için çalışmanın tüm aşamalarında verdiği büyük destek, rehberlik ve katkılar için minnettarlığımı sunarım.

Ayrıca, tezin veri toplama ve analiz aşamalarında desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Özek, Dr. Öğr. Üyesi Murat Abdulgani Kuş, Arş. Gör. Harun Karaca, bu çalışmanın başarısına önemli katkılarda bulundunuz. Teşekkürler.

Ayrıca, bu tez çalışmasının tamamlanmasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Yusuf Uçar'a, manevi desteklerinden dolayı annem Perihan Çolak, babam İsmail Çolak, kardeşlerim Nadide Ergün ve Gizem Çolak'a özel bir teşekkür borçluyum. Sizlerin motivasyonu ve inancı olmadan, bu zorlu yolculukta başarıya ulaşmak mümkün olmazdı.

Son olarak, bu tez çalışmasında adı geçmeyen ancak katkıları önemli olan herkese teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tamamlanmasında emeği geçen herkese teşekkür ederim.

ÖZET

Uçar, N., Sıçanlarda Nöromuskuler Elektrik Stimülasyonunun İskelet Kasının Mimari Özellikleri Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Nöromuskuler elektrik stimülasyonu (NMES) kas gücünü ve işlevini artırmak için klinikte sıklıkla kullanılan bir rehabilitasyon uygulamasıdır. Ancak, farklı kas uzunluklarında uygulanan NMES'in kas mimarisi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, orta ve uzun kas uzunluğunda uygulanan NMES'in iskelet kası mimarisi üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Yirmi dört sıçan rastgele dört gruba ayrıldı (iki NMES grubu ve iki kontrol grubu). Ekstansör digitorum longus kasına uzun kas uzunluğunda (170° plantar fleksiyonda) ve orta kas uzunluğunda (90° plantar fleksiyonda) NMES uygulandı. Her NMES grubu için bir kontrol grubu oluşturuldu. NMES 8 hafta boyunca, günde 10 dakika, haftada 3 gün uygulandı. Sekiz hafta sonra, kas örnekleri NMES uygulama uzunluklarında çıkarıldı; makroskopik ve mikroskopik olarak bir transmisyon elektron mikroskobu ve stereo-mikroskop kullanılarak incelendi. Daha sonra pennasyon açısı, lif uzunluğu, kas uzunluğu, kas kütlesi, fizyolojik kesit alanı, lif uzunluğu/kas uzunluğu, sarkomer uzunluğu, sarkomer sayısı gibi kasın mimari özellikleri ve kas hasarı değerlendirildi. Her iki uzunlukta uygulama yapılan kaslarda lif uzunluğu ve sarkomer sayısında artış, pennasyon açısında ise azalma görüldü ($p<0,05$). Uzun kas uzunluğu grubunda kas uzunluğu arttı ($p<0,05$), ancak yaygın kas hasarı gözlemlendi. Bu sonuçlar, uzun kas uzunluğunda NMES müdahalesinin kas uzunluğunu artırabildiğini ancak aynı zamanda kas hasarına da neden olduğunu göstermektedir. Kas uzunluğundaki daha büyük longitudinal artış, sürekli dejenerasyon-rejenerasyon döngüsünün bir sonucu da olabilir.

Anahtar Kelimeler: iskelet kası, kas mimarisi, elektrik stimülasyonu, sarkomer, transmisyon elektron mikroskobu.

ABSTRACT

Ucar, N., Effect of Neuromuscular Electrical Stimulation on Rat Skeletal Muscle Architecture, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Program of Physical Therapy and Rehabilitation Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2023.

Neuromuscular electrical stimulation (NMES) is a rehabilitation application frequently used in the clinic to improve muscle strength and function. However, the effect of NMES applied at different muscle lengths on muscle architecture is unknown. The aim of this study was to investigate the effects of NMES applied at medium and long muscle length on skeletal muscle architecture. Twenty-four rats were randomly divided into four groups (two NMES groups and two control groups). NMES was applied to the extensor digitorum longus muscle at long muscle length (170° in plantar flexion) and medium muscle length (90° in plantar flexion). A control group was formed for each NMES group. NMES was applied for 10 minutes a day, 3 days a week for 8 weeks. After eight weeks, muscle samples were removed at the NMES application lengths and examined macroscopically and microscopically using a transmission electron microscope and stereo-microscope. Architectural features of the muscle including pennation angle, fiber length, muscle length, muscle mass, physiological cross-sectional area, fiber length/muscle length, sarcomere length, sarcomere number and muscle damage were then evaluated. An increase in fiber length and sarcomere number and a decrease in pennation angle were observed in both lengths ($p<0,05$). In the long muscle length group, muscle length increased ($p<0,05$), but diffuse muscle damage was observed. These results suggest that NMES intervention at long muscle length can increase muscle length but also cause muscle damage. Furthermore, the greater longitudinal increase in muscle length may be the result of a continuous cycle of degeneration-regeneration.

Keywords: skeletal muscle, architecture, electrical stimulation therapy, sarcomere, transmission electron microscopy.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskelet Kası Mimarisi	3
2.1.1. Fizyolojik enine kesit alanı	3
2.1.2. Pennasyon Açısı	5
2.1.3. Kas lifi Uzunluğu	7
2.1.4. Lif uzunluğu/Kas uzunluğu (L_f/L_m) oranı	7
2.1.5. Sarkomer uzunluğu	7
2.1.6. Sarkomer Sayısı	9
2.2. İskelet Kasının Plastisitesi	10
2.2.1. İskelet kası mimarisinin statik germeye mimari adaptasyonu	10
2.2.2. İskelet kası mimarisinin egzersize adaptasyonu	10
2.2.3. İskelete Kası Mimarisinin Farklı Kas Uzunluklarındaki İmmobilizasyona Adaptasyonu	11
2.3. Nöromusküler Elektrik Stimülasyonu	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Deney Hayvanları	15
3.2. Deney Grupları ve Çalışma Planı	16
3.3. NMES Protokolü	17

3.4. Kas Dokularının Hazırlanması	19
3.5. Mimari Analizler	21
3.6. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Protokolü	24
3.6.1. Fiksasyon (+4 Derecede)	24
3.6.2. Yıkama (Oda ısısı, rotatorda)	24
3.6.3. Osmiyum Tetraoksit (OsO ₄) Fiksasyonu (Oda ısısı, rotatorda)	24
3.6.4. Yıkama (Oda ısısı, rotatorda)	24
3.6.5. Dehidratasyon (+4 derecede)	25
3.6.6. En Blok Staining (+4 derecede):	25
3.6.7. Dehidratasyon (+4 derecede) (devam)	25
3.6.8. Ara Çözelti	25
3.6.9. Gömme	25
3.7. Sarkomer Özellikleri	26
3.8. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	29
4.1. Kas Mimarisi	29
4.2. Sarkomer Özellikleri	37
4.3. Sarkomerogenezis	41
4.4. Kas Hasarı	53
5. TARTIŞMA	58
5.1. Kas Hasarı	60
5.2. Sarkomerogenezis	61
5.3. Sarkomer Morfolojisi	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	78
EK 1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK 2. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
EK 3. Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK 4. Dijital Makbuz	

9. ÖZGEÇMİŞ

84



SİMGELER VE KISALTMALAR

AKA	Anatomik enine kesit alanı
DOMS	Gecikmiş başlangıçlı kas ağrısı
ECM	Ekstrasellüler matriks
EDL	Extansör digitorum longus
EHL	Extensor hallucis longus
FEKA	Fizyolojik enine kesit alanı
G1	Grup 1
G2	Grup 2
K1	Kontrol 1
K2	Kontrol 2
L_f	Lif uzunluğu
L_f/L_m	Lif uzunluğu/ kas uzunluğu oranı
L_m	Kas uzunluğu
L_s	Sarkomer uzunluğu
MHC	Myosin heavy chain
MVC	Maksimum istemli kontraksiyon
NMES	Nöromüsküler elektrik stimülasyonu
OsO₄	Osmium tetraoksit
PA	Pennasyon açısı
S1	Uzun olan yarı sarkomerin uzunluğu
S2	Kısa olan yarı sarkomerin uzunluğu
SFT	Sörensen fosfat tamponu
SS	Sarkomer sayısı
TA	Tibialis anterior
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
Z1	Uzun olan yarı sarkomerin Z çizgisi kalınlığı
Z2	Kısa olan yarı sarkomerin Z çizgisi kalınlığı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İskelet kası mimarisi. (ML: kas uzunluğu; FL: lif uzunluğu)	3
2.2. Fizyolojik enine kesit alanı.	4
2.3. Teorik olarak fizyolojik enine kesit alanı modeli.	5
2.4. Pennat kaslarda, aynı boy ve aynı genişlikteki alana sığan aynı çaptaki lif miktarı longitudinal kaslara göre çok daha fazladır.	6
2.5. İnsan iskelet kası için teorize edilmiş sarkomer uzunluğu- kas gerilimi ilişkisi.	9
3.1. a) Grup 1 NMES uygulaması b) Grup 2 NMES uygulaması.	18
3.2. EDL kasının çıkarılması.	20
3.3. Kas boyu stabil tutularak EDL kasının iki numuneye ayrılması.	20
3.4. Lif uzunluğu ve pennasyon açısı ölçümleri.	22
3.5. Sarkomer uzunluğunun hesaplanması.	26
3.6. Sarkomere ait yapıların ölçülmesi.	27
4.1. Tedavi gruplarının sıçan kütleleri sonuçları.	31
4.2. Tedavi gruplarının kas kütlesi sonuçları.	31
4.3. Tedavi gruplarının kas uzunluğu ölçümlerinin sonuçları.	32
4.4. Tedavi gruplarının lif uzunluğu ölçümlerinin sonuçları.	33
4.5. Tedavi gruplarının pennasyon açısı ölçümlerinin sonuçları.	33
4.6. Tedavi gruplarının fizyolojik enine kesit alanı ölçümlerinin sonuçları.	34
4.7. Tedavi gruplarının lif uzunluğu/kas uzunluğu oranı sonuçları.	35
4.8. Tedavi gruplarının sarkomer uzunluğu ölçümlerinin sonuçları.	35
4.9. Tedavi gruplarının sarkomer sayısı sonuçları.	36
4.10. Tedavi gruplarının Z çizgisi kalınlığı ölçümlerinin sonuçları.	38
4.11. Tedavi gruplarının yarı sarkomer uzunluklarının sonuçları.	39
4.12. A bandı genişliği ölçümlerinin sonuçları.	40
4.13. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x2156).	41
4.14. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x6000).	42
4.15. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x2156).	43
4.16. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x6000).	44
4.17. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x16700).	45

4.18.	Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x2156).	46
4.19.	Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x6000).	47
4.20.	Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x16700).	48
4.21.	Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x16700).	49
4.22.	Grup 2 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x2156).	50
4.23.	Grup 2 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x7750).	51
4.24.	Kontrol 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x7750).	52
4.25.	Kontrol 2 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x7750).	53
4.26.	Grup 1 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x2156).	54
4.27.	Grup 1 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x7500).	55
4.28.	Grup 2 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x7750).	56
4.29.	Kontrol 1 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x7750).	57

TABLolar

Tablo		Sayfa
3.1.	İnsan ve sıçan EDL kasına ait mimari özellikler ve lif tipi dağılımı.	16
4.1.	Tedavi gruplarının EDL kasına ait mimari özelliklerinin sonuçları.	30
4.2.	Tedavi gruplarının sarkomer özelliklerinin sonuçları.	37



1. GİRİŞ

Nöromüsküler elektrik stimülasyonu (NMES), elektrik stimülasyonu cihazı ile uygulanan intermitant uyarılarla motor sinir ve dallarını depolarize ederek gözle görülebilir kas kontraksiyonları oluşturan bir rehabilitasyon uygulamasıdır. Uzun süreli immobilizasyon sırasında veya sonrasında, kas gücü ve fonksiyonunu korumak (1, 2), azalmış kullanım nedeniyle ortaya çıkan kas atrofisinde kas gücü ve fonksiyonunu artırmak (3), sağlıklı insanlarda kas fonksiyonunu iyileştirmek (yaşlılar, sporcular) (4, 5) ve ameliyat öncesi rehabilitasyonda kas fonksiyonunu artırmak (6) gibi amaçlarla klinikte sıklıkla kullanılmaktadır.

NMES'in etkinliği ve etki mekanizmaları farklı patolojilerde araştırılmıştır. Kas gücünü çeşitli metabolik, spinal ve supraspinal yollar aracılığıyla artırdığı gösterilmiştir (4). Ayrıca, NMES parametreleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. En uygun elektrot yerleşimi, dalga biçimi ve akım şiddetini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. NMES tedavilerinin etkinliğinin doza ve stimülasyon parametresine bağlı olduğu görülmektedir (7, 8).

Kas mimarisi, kas gücünü ve işlevselliğini doğrudan belirleyen ve etkileyen bir parametredir (9). Kas mimarisinin değişebildiği, germe, eksentrik egzersiz ve immobilizasyona adaptasyon sağladığı bilinmektedir. Germe ve eksentrik egzersizin lif uzunluğunu, kas uzunluğunu ve sarkomer sayısını artırdığı gösterilmiştir (10-12). Farklı kas uzunluklarında immobilize edilen kasların farklı mimari adaptasyonlar gösterdiği gözlenmiştir (13). Uzun kas uzunluğunda immobilize edilen kaslarda sarkomer sayısında artış gözlenirken, kısa kas uzunluğunda immobilize edilen kaslarda azalma gözlenmiştir (13).

NMES uygulamasının mimari etkileri de araştırılmıştır ancak sonuçlar farklılık göstermektedir. Devrimsel ve ark. (14), yaşlılara sekiz hafta boyunca NMES uygulamış ve kas kalınlığı ile fasikül uzunluğunun arttığını, pennasyon açısının ise değişmediğini göstermiştir. Melo ve ark. (15), diz osteoartriti olan yaşlılara sekiz hafta boyunca NMES uygulayarak kas kalınlığı ve pennasyon açısının arttığını, fasikül uzunluğunun ise değişmediğini göstermiştir. Shardong ve ark. (16), kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda sekiz haftalık NMES müdahalesinden sonra kas gücünün arttığını ancak kas

kalınlığı ve pennasyon açısının değişmediğini göstermiştir. NMES'in etkileriyle ilgili bu çelişkili sonuçların nedeni olarak değişken NMES parametreleri (frekans, amplitüd, durasyon, elektrot yerleşimi vb.) gösterilmiştir (17). NMES kullanılarak bu çalışmalarda kaslar farklı uzunluklarda pozisyonlanmıştır. Eklemlerin farklı açılarda pozisyonlanması ve bunun sonucunda farklı kas uzunluklarında uygulama yapılmış olması bu çelişkili sonuçlara neden olmuş olabilir. Farklı kas uzunluklarında uygulanan NMES'in kas mimarisi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. NMES'in farklı kas uzunluklarındaki etkisini anlamak, hastalarda daha etkili bir tedavi sonucu elde etmek için önemlidir.

Farklı kas uzunluklarında NMES uygulamasının kas hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir (18, 19). Bu çalışmalarda bir veya iki seanslık NMES uygulamalarının kısa ve uzun vadeli etkileri araştırılmıştır. Uzun kas uzunluklarında elektrik stimülasyonu ile oluşturulan izometrik kasılma ile daha fazla kas hasarı gözlenmiştir (18, 19). Ancak klinikte kas gücünü ve işlevselliğini artırmak için NMES'in iki seanstan daha fazla kullanılması gerekmektedir (17, 20). Farklı kas uzunluklarında uzun süre uygulanan NMES'in kas hasarı üzerindeki etkisi de bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, farklı kas uzunluklarında NMES uygulamasının iskelet kası mimarisi üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Hipotez 1

H0: NMES uygulamasını kasın uzun pozisyonunda uygulamanın iskelet kası mimarisi üzerine etkisi yoktur.

H1: NMES uygulamasını kasın uzun pozisyonunda uygulamanın iskelet kası mimarisi üzerine etkisi vardır.

Hipotez 2

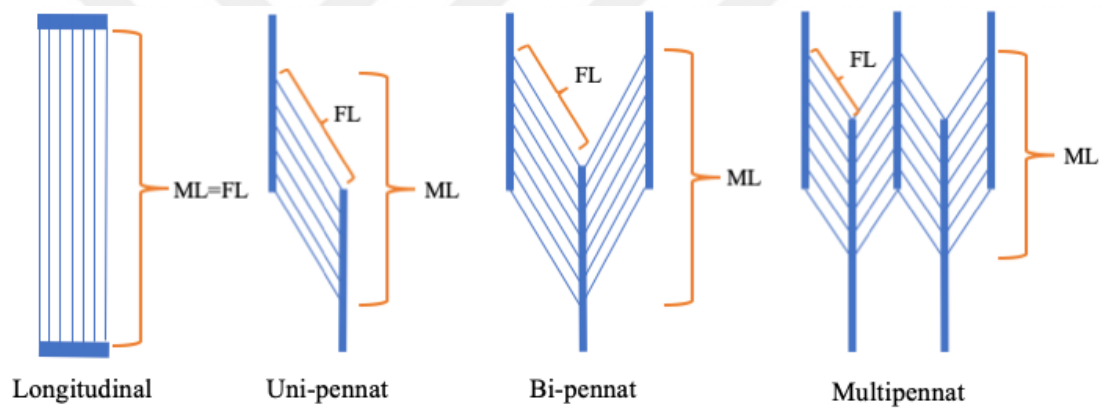
H0: NMES uygulamasını ara açılarda uygulamanın iskelet kası mimarisi üzerine etkisi yoktur.

H1: NMES uygulamasını ara açılarda uygulamanın iskelet kası mimarisi üzerine etkisi vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskelet Kası Mimarisi

İskelet kası mimarisi “kuvvet üretim eksenine göre kas liflerinin dizilimi” olarak tanımlanabilir. Neredeyse her kasın kendine ait farklı bir mimari yapısı vardır. Ancak genel olarak kaslar mimari özelliklerine göre dört gruba ayrılır (Şekil 2.1.). Kasın kuvvet üretim eksenine paralel uzanan lifler içeren kaslar longitudinal dizilimli kaslardır. Kuvvet üretim eksenine göre tek bir açıyla dizilim gösteren kaslar ise uni-pennat olarak adlandırılırlar. Kuvvet üretim eksenine göre iki açıyla uzanan lifler içeren kaslar bi-pennat, birden fazla açılanma gösteren kaslar da multipennat kaslardır (21).



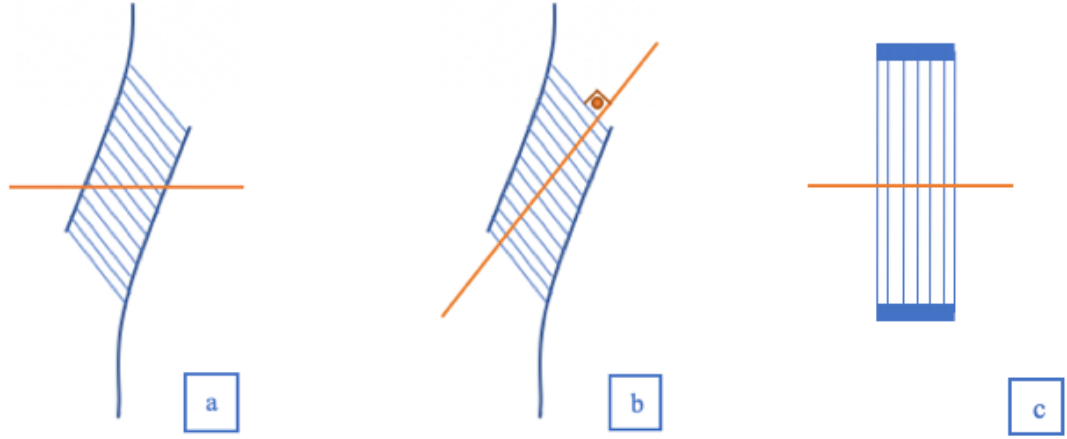
Şekil 2.1. İskelet kası mimarisi. (ML: kas uzunluğu; FL: lif uzunluğu)

2.1.1. Fizyolojik enine kesit alanı

Fizyolojik enine kesit alanı (FEKA), kas içindeki tüm kas liflerinin enine kesit alanlarının toplamını ifade eder. FEKA, bir kasın üretebildiği maksimum tetanik gerilim kuvveti ile doğru orantılıdır (22).

Longitudinal kasların anatomik kesit alanları ile fizyolojik enine kesit alanları yaklaşık aynı değerdir (Bkz. Şekil 2.2c.). Ancak, kasların büyük bir çoğunluğunun pennat yapıda olmasından dolayı kasların anatomik enine kesit alanları bize FEKA hakkında kesin bilgi vermemektedir (Bkz. Şekil 2.2a.). Kesin veri için tüm kas liflerini 90° dik bir şekilde kesen bir kesit almak gerekmektedir (Bkz. Şekil 2.2b.) ancak bu mümkün değildir. Çünkü kaslar oldukça kompleks bir geometriye sahiptirler. Bu

nedenle US, BT veya MRI gibi görüntüleme yöntemleriyle herhangi bir anatomik düzlemde bu kesiti yakalamak mümkün değildir (23).



Şekil 2.2. Fizyolojik enine kesit alanı. Pennat bir kasın anatomik kesiti (a), pennat kasın tüm kas liflerini 90° dik bir şekilde kesen bir kesit (b), longitudinal bir kasın anatomik kesiti (c).

FEKA'yı tahmin edebilmek için teorik olarak bir formül geliştirilmiştir (Formül 1.1.). Bu formülde kütle/yoğunluk bize kas hacmini vermektedir (Formül 1.2.). Bir kası, içerdiği tüm kas liflerini paralel bir şekilde yan yana getirerek bir demet şeklinde oluşturduğumuz bir silindir gibi düşünersek, kas hacminin lif uzunluğuna bölünmesi bize bu silindirin enine kesit alanını verir (Bkz. Şekil 2.3b.) (Formül 1.4.). Ancak bu anatomik kesit alanı (AKA) değildir. Bu, teorik bir alandır. Çünkü, her zaman kas uzunluğu lif uzunluğuna eşit değildir (Bkz. Şekil 2.1.). Şekil 2.2a.'da bizim örneğimizdeki anatomik enine kesit gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi böyle bir kesit kasın içerdiği tüm liflerin bir kesitini almamaktadır.

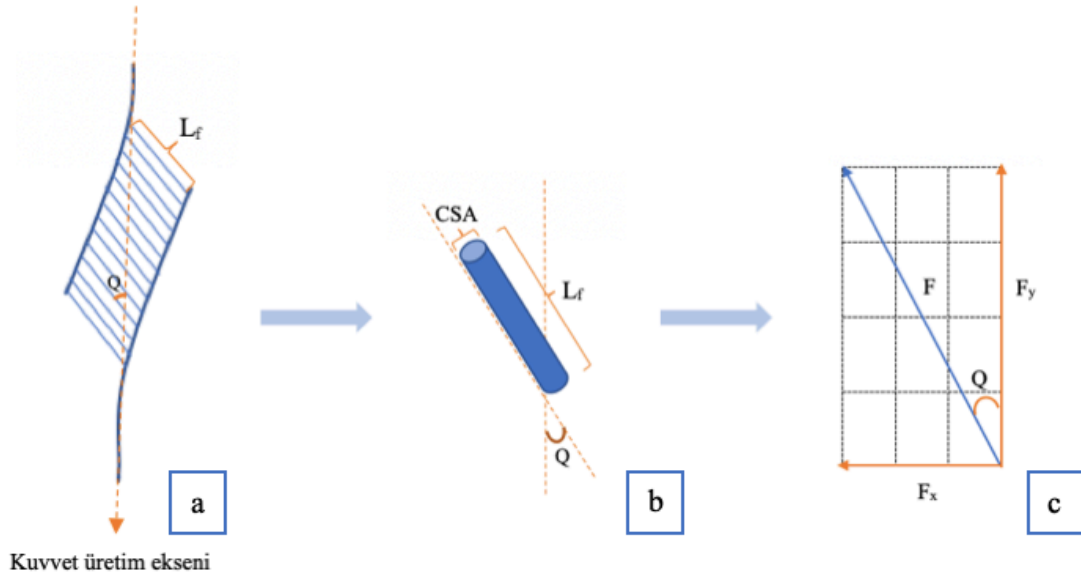
$$FEKA (mm^2) = \frac{M (g) \times \cos Q}{p (g/mm^3) \times L_f (mm)} \quad (1.1.)$$

$$Hacim (cm^3) = Kas \text{ kütlesi } (g) / p (g/cm^3) \quad (1.2.)$$

$$FEKA (mm^2) = \frac{V (cm^3) \times \cos Q}{L_f (mm)} \quad (1.3.)$$

$$CSA (cm) = Hacim (cm^3) / Lif \text{ uzunluğu } (cm) \quad (1.4.)$$

$$FEKA = CSA (cm^2) \times \cos Q \quad (1.5.)$$



Şekil 2.3. Teorik olarak fizyolojik enine kesit alanı modeli. Q : pennasyon açısı, L_f : lif uzunluğu, CSA : enine kesit alanı, F : kuvvet, F_x ve F_y : F kuvvetinin bileşenleri, F_y : F kuvvetinin kuvvet üretim eksenine paralel olan bileşeni.

Her bir kas lifi, kasın kuvvet üreten bir birimi olduğu için kasın içerdiği lif miktarı ve lif çapı kasın ürettiği maksimal kuvvet ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle Formül 1.5.'te AKA'nı kasın ürettiği kuvvet olarak düşünebiliriz. Kas lifleri, kuvvet üretim eksenine açılı bir şekilde yerleşim gösterdiği için bu açının kosinüs değerinin bu denkleme eklenmesi, üretilen kuvvetin kuvvet üretim eksenine, dolayısıyla tendona ne kadarının iletildiğini bize vermektedir (Şekil 2.3c.) (Formül 1.5.) (24).

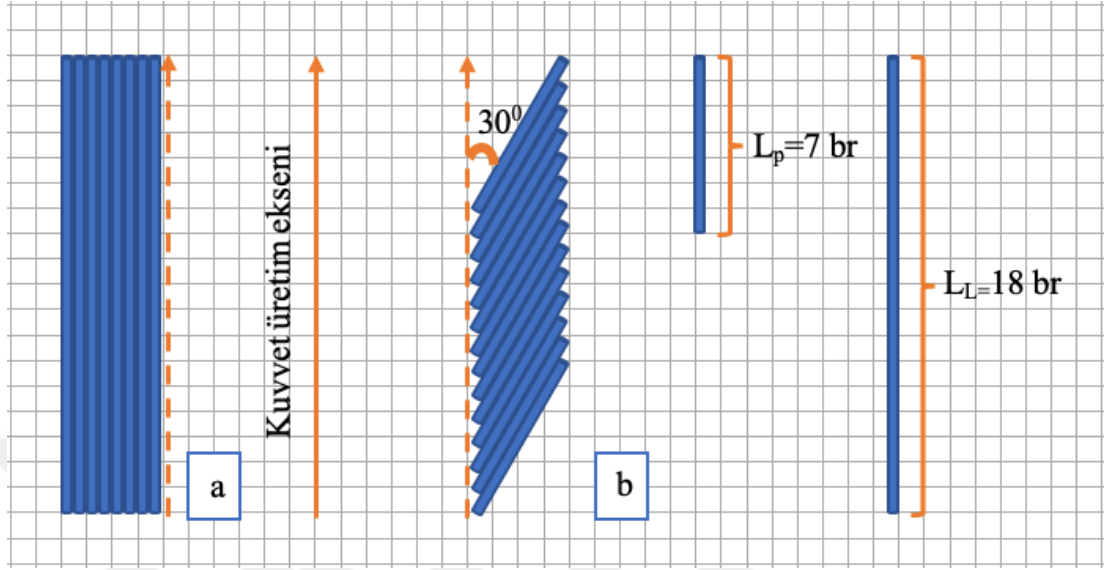
2.1.2. Pennasyon Açısı

Pennasyon açısı (PA), kas liflerinin kuvvet üretim eksenine göre yaptığı açılanmaya denir. Pennat kaslarda üretilen gerilim kuvvetinin tamamı kasın tendonuna iletilmemektedir. Şekil 2.3c.'de gösterildiği gibi F_y değeri, kas tarafından üretilen kuvvetin (F), kuvvet üretim eksenine iletilen bileşenidir (Formül 1.6.) (23).

$$F_y = F \times \cos Q \quad (1.6.)$$

PA, istirahat durumunda 0° - 30° arasında değişkenlik göstermektedir. $\cos Q$ değeri 1'e eşittir. Bunun dışındaki " $\cos Q$ " değerleri her zaman için 1'den küçüktür. Bu nedenle, pennat kaslarda kuvvet kaybı olduğunu düşünebiliriz. Ancak bu açılanma,

dar alanlarda daha fazla sayıda lif paketleme konusunda avantaj sağlamaktadır (Şekil 2.4.) (9).



Şekil 2.4. Pennat kaslarda, aynı boy ve aynı genişlikteki alana sığan aynı çaptaki lif miktarı longitudinal kaslara göre çok daha fazladır. L_L : longitudinal kasın lif uzunluğu (a); L_p : pennat kasın lif uzunluğu (b).

Böylece eşit kütleye sahip iki sağlıklı kası kuvvet yönünden karşılaştıracak olursak, pennat kas longitudinal bir kasa göre daha yüksek FEKA'ya sahip olacaktır. Şekil 4'teki örneğe göre hesaplayacak olursak, longitudinal kasın (Şekil 2.4a.) lif uzunluğu 18 birim (L_L), pennasyon açısı 0° ($\cos 0=1$); pennat kasın (Şekil 2.4b.) lif uzunluğu 7 birim (L_p), pennasyon açısı 30° ($\cos 30=0,87$) olan, her ikisi de M kütleye sahip iki kasın FEKA'larını oranladığımızda, aynı kütleye sahip pennat kasın ($FEKA_p$), longitudinal kasa ($FEKA_L$) göre 2 kat daha fazla kuvvet üretme yeteneğine sahip olduğunu görebiliriz (Formül 1.7.) (24).

$$\frac{FEKA_p}{FEKA_L} = \frac{(M \times 0,87) \div (p \times 7)}{(M \times 1) \div (p \times 18)} = 2,2 \quad (1.7.)$$

2.1.3. Kas lifi Uzunluğu

Kas lifi uzunluğu sıklıkla eksürsiyon (longitudinal yer değiştirme) ve hız ile ilişkilendirilmektedir. Bir kas ne kadar uzun liflere sahipse, kasın longitudinal yer değiştirme miktarı ve hızı o kadar fazladır (23).

Ancak, bir kas içerisinde veya bir kas fasikülü içerisindeki tüm kas liflerinin uzunlukları eşit değildir (25, 26). Bazı lifler fasikül boyunca uzanırken, bazı lifler ise fasikül içerisinde sonlanmaktadır. Fasikül içerisinde sonlanan lifin sivrilmiş ucu endomisyal bağ dokuda sonlanır. Endomisyal bağ dokunun yanal yük taşıma özelliği sayesinde ürettikleri kuvveti fasikül sonuna myotendinöz bileşkeye iletebilirler (27). Ayrıca, yavaş kasılan motor ünitler hızlı kasılan motor ünitlere göre daha benzer lif uzunluklarına sahiptirler (25).

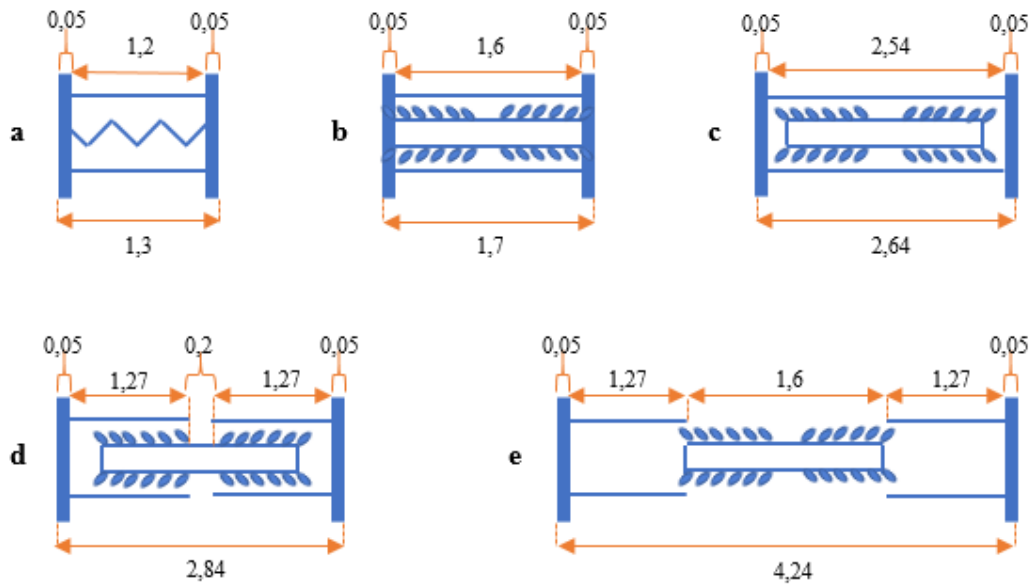
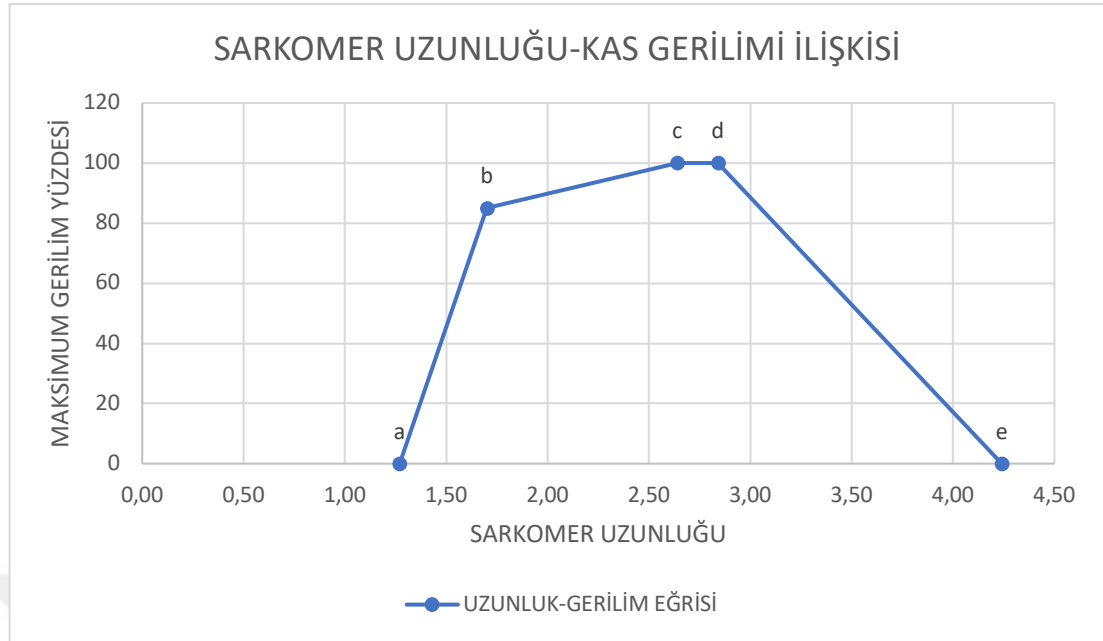
2.1.4. Lif uzunluğu/Kas uzunluğu (L_f/L_m) oranı

L_f/L_m oranı iskelet kaslarında 0,2-0,8 aralığındadır (9, 28, 29). Longitudinal kaslarda bile kas lifleri kas uzunluğunun %60'ı boyunca uzanmaktadır (9). L_f/L_m oranı, kasın eksürsiyon oluşturma potansiyelinin bir göstergesidir. Bu oran kas lifi uzunluğunun mutlak büyüklüğünden bağımsız olarak kaslar arasında tasarım karşılaştırmalarına izin verir. Düşük FEKA, yüksek L_f/L_m oranına sahip olan kasların daha çok yüksek hız ve eksürsiyon tasarımına sahip olduğunu söyleyebiliriz (23).

2.1.5. Sarkomer uzunluğu

Sarkomer uzunluğu, kas kuvvetine etki eden önemli bir parametredir. Sarkomer uzunluğu ile kas kuvveti arasındaki ilişki uzunluk-gerilim eğrisi ile açıklanmıştır (Bkz. Şekil 2.5.) (30). İnsan iskelet kasında farklı sarkomer uzunluklarında maksimum izometrik gerilim kuvveti ölçüldüğünde, en yüksek gerilim kuvvetinin 2,64 μm uzunluğunda açığa çıktığı gözlenmiştir (31). Bu değere optimal sarkomer uzunluğu denilmektedir. Bunun altında veya üstündeki uzunluklarda gerçekleştirilen maksimum izometrik gerilim kuvvetinin giderek düştüğü görülmüştür. Farklı türlerde optimal sarkomer uzunluğu da farklıdır. Bunun nedeni aktin filamenti uzunluğunun farklı canlı türlerinde değişkenlik göstermesidir. İnsan iskelet kasında aktin

filamentinin uzunluğu 1,27 μm 'dir. Aktin filament uzunluğunun iki katını alarak bu değere Z diski genişliğinin (0,05 μm) iki katını eklersek optimal sarkomer uzunluğunu elde ederiz. Myozin filamentinin orta 0,2 μm 'lik kısmında miyozin başı bulunmamaktadır. Bu aralık kas gerilimini etkilemediği için 2,64-2,84 μm aralığında maksimal kas gerilimi değişmemektedir (Bkz. Şekil 2.5c-d.). Sarkomer uzunluğu 2,64 μm 'nin altına düştüğünde, birbirine doğru yaklaşan aktin filamentleri üst üste gelerek bağlanma alanlarını kapatmaya başladığı için çapraz köprü oluşumunu engeller. Bu nedenle sarkomer uzunluğu kısaldıķça gerilim kuvveti de doğrusal olarak düşer (Bkz. Şekil c-b). Ancak bu düşüş 1,7 μm 'nin altında daha keskindir (Bkz. Şekil b-a). Bunun da miyozinin bu noktadan sonra kısaltmaya karşı direnç oluşturmasından kaynaklandığı düşünölmektedir (Bkz. Şekil 2.5a, b.). 2,84 μm üzerindeki uzunluklarda aktin ve miyozinin örtüşme alanı giderek azalığı için eğrinin d-e aralığında maksimum gerilim kuvveti doğrusal olarak azalarak hiç temas kalmadığı 4,24 μm uzunluğunda sıfırlanır (Bkz. Şekil 2.5e.) (29).



Şekil 2.5. İnsan iskelet kası için teorize edilmiş sarkomer uzunluğu- kas gerilimi ilişkisi. Uzunluk-gerilim eğrisinde etiketlenmiş önemli noktalara (a-b-c-d-e) karşılık gelen sarkomerler altta şematik olarak sunulmuştur (31, 32).

2.1.6. Sarkomer Sayısı

Caiozzo ve ark. (33), sarkomerogenezis mekanizmasına ilişkin uzunluk-sensor hipotezini öne sürmüşlerdir. Sıçan soleus kasında yaptıkları çalışmada, 2,7 μm uzunluğun bir kırılma noktası olduğunu, bunun üzerindeki sarkomer uzunluklarında

sarkomer sayısının arttığını göstermişlerdir. Sarkomer sayısı artışının kas lifinin son kısımlarında kas-tendon bağlantılarına yakın bölgelerde daha fazla meydana geldiği gösterilmiştir (34).

2.2. İskelet Kasının Plastisitesi

İskelet kası, uygulanan yüklenmelere yüksek derecede adaptasyon gösterme yeteneğine sahiptir. İskelet kasının bu yeniden şekillenebilme yeteneğine kas plastisitesi denir. Kas plastisitesi her zaman ilgi odağı olmuştur. Çeşitli yüklenme türleri (18, 30, 35-41), immobilizasyon (13, 42-44), azalmış kullanma (45, 46) gibi durumlarda ve çeşitli patolojilerde (16, 47-50) ne gibi yapısal adaptasyonlar gösterdiği literatürde sıklıkla incelenmiştir.

2.2.1. İskelet kası mimarisinin statik germeye mimari adaptasyonu

Statik germe, kas performansını kas uzunluk ve elastikiyetini artırmak, uzun süreli immobilizasyon ve azalmış kullanmada kas uzunluk ve elastikiyetinin, eklem hareket açıklığının korunması amacıyla klinikte sıklıkla kullanılan bir uygulamadır. Germanin iskelet kası mimarisi üzerine ne gibi etkileri olduğu incelenmiştir. Kronik statik germenin pennasyon açısını daraltırken, lif/fasikül uzunluğunu ve sarkomer sayısını arttırmaktadır (11, 36, 51).

2.2.2. İskelet kası mimarisinin egzersize adaptasyonu

Morgan ve ark. (52), sarkomer uzunluğunun kasın çalışma aralığının uzunluk-gerilim eğrisinin yükselen kolunda ve platosunda kalması gerektiğini öne süren bir teoriye dayanarak, eksentrik ve konsentrik egzersizlerin kas üzerinde farklı mimari adaptasyonlar göstereceğini ileri sürmüşlerdir. Bu hipotezi yokuş yukarı ve yokuş aşağı koşu antrenmanları ile test etmişlerdir. Vastus intermedius kası yokuş yukarı koşuda konsentrik kontraksiyon gerçekleştirirken, yokuş aşağı koşuda eksentrik kontraksiyon gerçekleştirmektedir. Yokuş yukarı koşu antrenmanı sonucunda sarkomer sayısında azalma görülürken, yokuş aşağı koşu antrenmanı sonucunda sarkomer sayısında artış görülmüştür.

Eksentrik egzersiz sonucu lif/fasikül uzunluğu artar, pennasyon açısı daralır, kas kalınlığı artar (53-55). Konsentrik egzersiz sonucu ise lif/fasikül uzunluğu azalır, pennasyon açısı artar, kas kalınlığı artar (54, 56, 57).

Kontraksiyon türleri arasındaki adaptasyon farklılıkları, kuvvet üretmek için kullanılan farklı mekanizmaların bir sonucudur. Eksentrik kontraksiyon fasiküllerin aktif olarak uzaması, konsentrik kontraksiyon ise aktif kısalması ile meydana gelir. Ancak eksentrik egzersiz miyozin başlarının zaten aktine bağlı olduğu ve çapraz köprülerin uzamasıyla ayrılmaya zorlandığı ve kas hasarına neden olan bir uyarın sağlar (58). Sonuç olarak yüksek düzeyde kas hasarı meydana gelir ve gecikmiş başlangıçlı kas ağrısı (DOMS) ile sonuçlanır (59). Sarkomer strain teorisine göre kas hasarı sonucunda rejenerasyon süreci longitudinal seri sarkomer eklenmesiyle sonuçlanır ve böylece kas hasarına karşı koruyucu bir adaptasyon geliştirmiş olur (52, 60).

2.2.3. İskelet Kası Mimarisinin Farklı Kas Uzunluklarındaki İmmobilizasyona Adaptasyonu

Hücre iskeleti ve ekstrasellüler matriks arasındaki bağlantıyı sağlayan integrinler hücre içi ve dışında üretilen mekanik kuvvetlerin bu iki ortam arasındaki iletimini sağlar (61). Bu mekanik kuvvetlerin iletimi çeşitli hücresel yanıtlar oluşturur ve hücrede metabolik, yapısal ve mimari değişimlere yol açar (62). Kısacası mekanik yüklenmeler, hücresel yanıtlara dönüşür. Bu mekanik streslere karşı hücrelerin gösterdiği tüm bu adaptasyon mekanizmaları mekanotransdüksiyon olarak tanımlanır. Bu kuvvetler, hücrenin dışarıdan maruz kalacağı bir germe veya kompresyon kuvveti olabileceği gibi, içerde oluşturduğu kas gerilimi de olabilir (63). Örneğin, uzun süreli germe ve kas gerilimi, IGF-1 izoformları dahil olmak üzere büyüme faktörlerinin yukarı regülasyonu, salınımı ve uydu hücrelerinin aktivasyonuna yol açar (63-65).

İskelet kası, kasın en uzun pozisyonunda immobilize edildiğinde sarkomer sayısının arttığı, en kısa pozisyonunda immobilize edildiğinde ise sarkomer sayısının azaldığı gösterilmiştir (34, 44). İmmobilizasyon süresi ile sarkomer sayısı artışının da

doğru orantılı olduğu gözlenmiştir (44). Kasın uzun pozisyonunda sarkomerlerin uzunlukları da artarken, kısa pozisyonunda sarkomer uzunlukları kısalmaktadır. Uzunluk-gerilim ilişkisine göre sarkomer uzunluğunun optimal uzunluktan uzaklaştıkça maksimum kas kuvveti de doğrusal olarak azalır. Kas, maksimum kas kuvvetini korumak için sarkomer uzunluğunu belirli bir uzunlukta tutma eğilimindedir (9). Uzun süreli immobilizasyonlarda iskelet kası immobilize edildiği kas uzunluğuna göre mekanotransdüksiyon mekanizmaları sonucunda, sarkomer sayısını revize ederek istirahat uzunluğunu immobilizasyon uzunluğuna göre yeniden bir organizasyon oluşturur.

2.3. Nöromuskuler Elektrik Stimülasyonu

Nöromuskuler elektrik stimülasyonu, intermitant uyarılarla intramuskuler sinir liflerini uyarak gözle görülebilir kas kontraksiyonları oluşturmayı sağlayan bir rehabilitasyon uygulamasıdır. Klinikte kullanmama ve immobilizasyona bağlı kas atrofilerinin önlenmesinde ve iyileştirilmesinde (66-69), herhangi bir patoloji olmayan durumlarda ise kaslarda kas kuvveti ve fonksiyonunu artırmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (70-73).

NMES uygulamasının iskelet kasında çeşitli metabolik (74-76), nöral (7, 73, 77-79), fonksiyonel adaptasyonlar geliştirdiği (80-82) ve kas fonksiyonunu iyileştirdiği literatürde sıklıkla gösterilmiştir. Ayrıca NMES parametreleri de araştırılmış, en uygun elektrot yerleşimi, dalga formu, akım şiddeti ve frekansı konusunda çalışmalar yapılmıştır (7, 17, 83-85). NMES yoğunluğu, elektrik stimülasyonu ile oluşturulan kontraksiyon şiddeti olan maksimum istemli kontraksiyona göre uyarılan kuvvet seviyesidir (%MVC). Optimum kuvvet kazanımı için NMES yoğunluğunun mümkün olduğunca yüksek dozlarda uygulanması önerilmektedir (17). Kuvvet kazanımı ve NMES yoğunluğu arasındaki bu pozitif ilişki, doz-yanıt ilişkisi olarak literatürde tanımlanmıştır (86). NMES yoğunluğunu maksimize etmek için 2 temel NMES parametresi vardır; akım yoğunluğu ve akım frekansı (17, 84). Maksimum kas gerilimi üretebilmek için geniş atımlı, yüksek frekanslı (83) ve tolere edilebilen en yüksek şiddetteki akım önerilmektedir (85).

NMES uygulamasının, kas mimarisine olan etkileri de incelenmiştir. Ancak sonuçlar çelişkilidir. Devrimsel ve ark. (14), yaşlı hastaların sekiz hafta boyunca quadriceps kasına oturma pozisyonunda (kalça 90°, diz 60°) NMES uygulaması yapmışlar ve kas kalınlığı ile fasikül uzunluğunun arttığını, pennasyon açısının ise değişmediğini göstermişlerdir. Melo ve arkadaşları (15) diz osteoartriti olan yaşlıların quadriceps kasına oturma pozisyonunda (kalça 90°, diz 90°) sekiz hafta boyunca NMES uygulayarak kas kalınlığının ve pennasyon açısının arttığını, fasikül uzunluğunun ise değişmediğini göstermişlerdir. Shardong ve arkadaşları (16) kronik böbrek yetmezliği olan hastaların quadriceps kasına sırtüstü yatış pozisyonunda (diz 60°) sekiz haftalık NMES uygulamasından sonra kas gücünün arttığını ancak kas kalınlığı ve pennasyon açısının değişmediğini göstermişlerdir. NMES'in etkileriyle ilgili bu çelişkili sonuçların nedeni olarak değişken NMES parametreleri (frekans, genlik, süre, elektrot yerleşimi vb.) gösterilmiştir (17). Ancak bu çalışmalarda NMES farklı kas uzunluklarında uygulanmıştır. NMES kullanılarak yapılan tedavilerde kaslar farklı uzunluklarda konumlandırılır. Eklemelerin değişken açıları ve kasların uzunluğu çelişkili sonuçlardan sorumlu olabilir. Ancak farklı kas uzunluklarındaki NMES'in kas mimarisi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. NMES'in farklı kas uzunluklarındaki etkisini anlamak, hastalarda etkili işlevselliğe ulaşmak için önemlidir.

NMES, hastalarda ve sağlıklı bireylerde kas fonksiyonunu iyileştirmek veya eski haline getirmek için tercih edilen bir yöntem olsa da, elektriksel olarak oluşturulan submaksimal izometrik kasılmaların kas hasarına yol açabileceğini gösteren güçlü kanıtlar vardır (87, 88). İstemli kontraksiyonda motor üniteler büyüklük prensibine göre uyarılırken, NMES'in düşük akım seviyelerinde bile hızlı motor ünitelerin büyük çaplı aksonlarını yavaş ve küçük çaplı aksonlara göre daha kolay uyardığı gösterilmiştir (88). NMES gerçekten de uyarılan kaslar içinde alışılmadık stres ve gerilmeye neden olabilir ve bu durum uzun kas uzunluklarında daha da şiddetli olabilir (18, 19). NMES seansından sonra, uzun kas uzunluklarında gerçekleştirilen elektrikle uyarılmış submaksimal izometrik kasılmaların ciddi hasara neden olduğu bildirilirken kısa kas uzunluklarında uygulanan NMES'ten sonra kas hasarı bulguları olmadığı veya küçük değişiklikler olduğu gösterilmiştir (18).

Bu çalışmanın amacı, farklı uzunluklardaki iskelet kaslarında uzun süreli NMES uygulamasının kas mimarisi üzerindeki etkisini araştırmaktır. Uzun kas uzunluğunda sarkomerlerin orta uzunluğa göre daha gergin olduğunu varsaydık. Uzun kas uzunluklarındaki kas immobilizasyonunun sonuçlarına dayanarak, daha yüksek derecede kas hasarının ve dolayısıyla seri sarkomerogenezis için daha yüksek bir uyarının meydana geleceğini varsayarak, uzun kas uzunluğunda NMES uygulanan hayvan grubunda daha uzun fasikül uzunluğu ve daha küçük fasikül pennasyon açısı ortaya çıkmasını bekledik.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

“Sıçanlarda Nöromusküler Elektrik Stimülasyonunun İskelet Kasının Mimari Özellikleri Üzerine Etkisi” adlı çalışmamız, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

Çalışma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 19.06.2019 tarih ve 525 sayılı kararı ile onaylandı (EK 1). Tüm deneysel prosedürler; “Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi”, “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlarla Kullanılacak Omurgalı Hayvanların Korunması Hakkında Avrupa Konvensiyonu” ve “6 Temmuz 2006 tarihli ve 26220 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Çevre ve Orman Bakanlığının hazırladığı “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” te belirlenen esaslara göre yürütüldü.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, Wistar Albino 9-10 haftalık (250-300 gr) erkek sıçanlar kullanıldı. İki deney grubu ve iki kontrol grubu oluşturuldu. Referans çalışmada elde edilen etki büyüklüğünün oldukça yüksek düzeyde olduğu ($d=2.13$) görüldü (42). Daha düşük düzeyde bir etki büyüklüğü de elde edilebileceği düşünülerek ve çalışmamız 4 grup olacağı için, yüksek düzeyde etki büyüklüğüne ($d=0.8$) göre yapılan güç analizi sonucunda; çalışmaya en az 24 sıçan (her grup için en az 6 sıçan) alındığında %95 güven düzeyinde %80 güç elde edilebileceği hesaplandı. Anestezi nedeni ile her iki deney grubundan birer sıçan kaybedildi. Gruplara yeni sıçan eklenerek çalışmaya devam edildi. Toplam 26 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma merkezinden temin edildi ve çalışmanın deney aşaması yine burada yapıldı.

Hayvanlar standart kafeslerde 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış, %40-60 nem rölatif nem oranına ve 20^0 - 24^0 ortam sıcaklığına sahip odalarda barındırıldı. Kafeslerde 6’şar adet sıçan konaklatıldı. Herhangi bir hareket kısıtlaması yapılmadı. Sıçanlar aynı tip yem ve suyu ad libidum (serbest, kendi istedikleri zaman ve miktarda beslenme) tükettiler. Herhangi bir ek besin uygulaması yapılmadı.

3.2. Deney Grupları ve Çalışma Planı

NMES uygulaması için, yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin iyi tanımlanmış olması insan kası ile benzer özellik göstermesi nedeniyle Ekstansör Digitorum Longus (EDL) kası kullanıldı. Tablo 3.1.'de insan ve sıçan EDL kasına ait mimari özellikler sunulmuştur (89, 90).

Tablo 3.1. İnsan ve sıçan EDL kasına ait mimari özellikler ve lif tipi dağılımı.

	M (mg)	L _m (cm)	L _f (cm)	L _s (μm)	PA (°)	FEKA (cm ²)	L _f /L _m	Tip1 %	Tip2a %	Tip2x %	Tip2b %
İnsan	41,0 ± 12,6	29,0 ± 2,33	6,93 ± 1,14	3,12 ± 0,20	10,8 ± 2,8	5,6 ± 1,7	0,4 ± 0,04	2	42	0	56
Sıçan	131,83 ± 3,24	2,81 ± 0,09	1,34 ± 0,10	2,33* - 3,09**	9,0 ± 1,10	0,09 ± 0,01	0,48 ± 0,05	0,00 ± 0,00	10,53 ± 0,40	25,08 ± 1,40	64,40 ± 1,33

*Sıçan EDL kasında ölçülen en kısa sarkomer uzunluğu, **Sıçanlar EDL kasında ölçülen en uzun sarkomer uzunluğu (91). M: kas kütlesi; L_m: kas uzunluğu; L_f: fasikül uzunluğu; PA: pennasyon açısı; FEKA: fizyolojik enine kesit alanı; L_f/L_m: lif uzunluğu/kas uzunluğu.

Sıçanların gruplara ayrılması, çalışma protokolünü bilmeyen bir araştırmacı tarafından basit randomizasyon ile yapıldı. Sıçanlar; grup 1, grup 2, kontrol 1 ve kontrol 2 olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (G1): Grup 1'deki sıçanlara NMES, kasın en uzun ve gergin pozisyonunda yani diz 90° fleksiyon, ayakbileği maksimum plantar fleksiyonda (~170°) olacak şekilde uygulandı (91) (Bkz. Şekil 3.1a.).

Sekiz haftalık NMES uygulamasının tamamlanmasında 1 hafta sonra, EDL kasları diz 90° fleksiyon, ayakbileği maksimum plantar fleksiyonda (~170°) pozisyonlanarak çıkarıldı (Bkz. Şekil 3.2c.). Kaslar, bu pozisyonadaki kas boyunu korumak için tahta bir çubuğa suturlanarak çıkarıldı (Bkz. Şekil 3.3a.). Bu uzunlukta değerlendirilmek üzere doku fiksasyonu uygulandı.

Grup 2 (G2): Grup 2'deki sıçanlara NMES uygulanırken diz ve ayak bileği 90° olacak şekilde pozisyonlandı (Bkz. Şekil 3.1b.). Kasın orta kas uzunluğu için ayak bileği

açısının 90^0 seçilmesinin iki sebebi vardı. Birincisi, sıçanların normal yürüyüş sırasında ayak bileği eklem hareket açısının 41^0 - 146^0 aralığında olduğu gösterilmiştir (92). Bu fonksiyonel eklem hareket aralığının orta açısı $\sim 90^0$ 'di. İkincisi, sıçanlarda normal yürüyüş sırasında duruş fazında ayak bileği eklem açısı ortalama $90^0 \pm 20$ aralığındadır (93) ve bu aralığın orta açısı $\sim 90^0$ 'di.

Sekiz haftalık NMES uygulamasının tamamlanmasından 1 hafta sonra, EDL kasları diz ve ayak bileği 90^0 olacak şekilde pozisyonlanarak çıkarıldı (Bkz. Şekil 3.2b.). Kaslar, bu pozisyonadaki kas boyunu korumak için tahta bir çubuğa süturlanarak çıkarıldı (Bkz. Şekil 3.3a.). Bu uzunlukta değerlendirilmek üzere doku fiksasyonu uygulandı.

Kontrol 1 (K1): Sıçanlara NMES uygulaması yapılmadı. Kaslar çıkarılırken Grup 1 ile aynı metot uygulandı. Diz 90^0 fleksiyon, ayakbileği maksimum plantar fleksiyonda ($\sim 170^0$) pozisyonlandıktan sonra kaslar kas boyunu korumak için tahta bir çubuğa süturlandı (Bkz. Şekil 3.2c.). Kaslar değerlendirilmek üzere bu uzunlukta çıkarılıp doku fiksasyonu yapıldı.

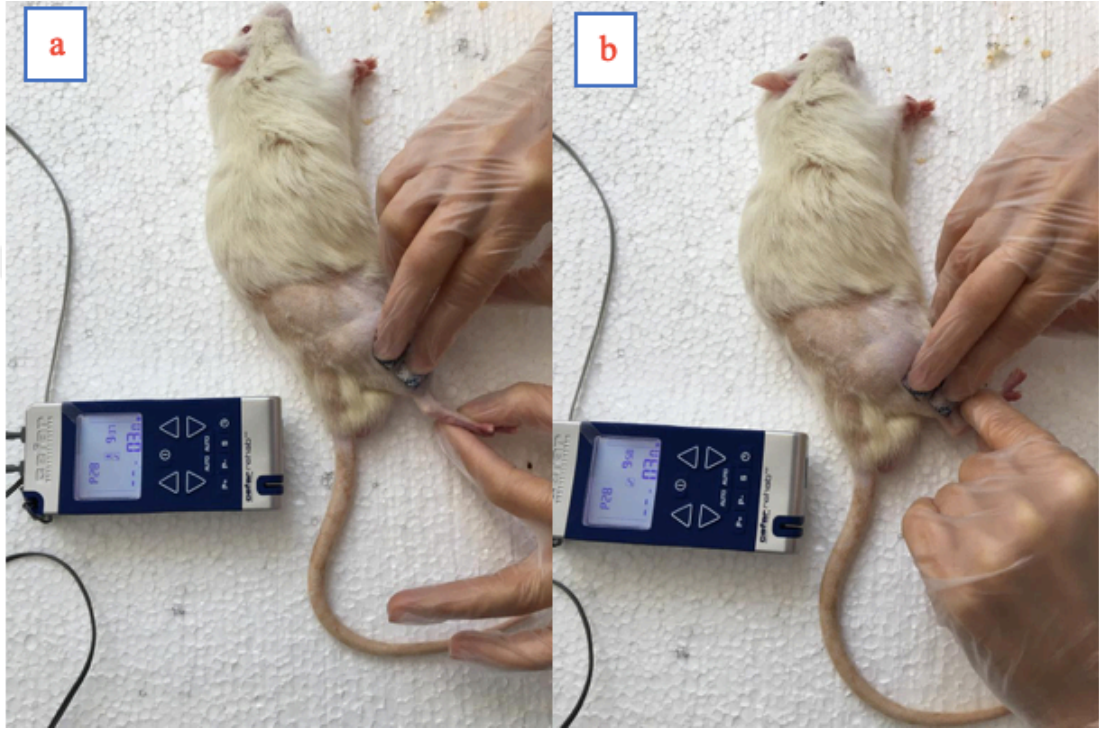
Kontrol 2 (K2): Sıçanlara NMES uygulaması yapılmadı. Kaslar çıkarılırken Grup 2 ile aynı metot uygulandı. Diz ve ayak bileği 90^0 olacak şekilde pozisyonlandıktan sonra kaslar kas boyunu korumak için tahta bir çubuğa süturlandı (Bkz. Şekil 3.2b.). Kaslar değerlendirilmek üzere bu uzunlukta çıkarılıp doku fiksasyonu yapıldı.

Çıkarılan EDL kaslarının doku takipleri yapılarak; kas kütlesi, kas uzunluğu, lif uzunluğu, pennasyon açısı, fizyolojik enine kesit alanı, sarkomer uzunluğu, sarkomer sayısı, lif uzunluğu/kas uzunluğu ölçümleri yapıldı.

3.3. NMES Protokolü

Her NMES uygulama seansı öncesi sıçanlar ksilazin/ketamin kombinasyonu (10/90 mg/kg) ile intramuskuler yolla uyuşturuldu. Tüm seans boyunca anestezi kontrol edildi. Göz merhemi kullanarak anestezi boyunca göz kuruluşunun oluşması engellendi. Sağ arka bacak tıraşlandıktan sonra alkol ile silindi. Yan yatış pozisyonunda pozisyonlandı.

Manuel olarak ayarlanabilen taşınabilir stimülatör kullanıldı (Cefarcompex Cefar Rehab 2x). 1x1,5 cm büyüklüğünde iki adet yüzeysel elektrot fibula laterale, peroneal sinirin derin dalının trasesine, yerleştirilerek Ekstansör Digitorum Longus (EDL) kası uyarıldı (Şekil 3.1.). Elektrot yerleşimi ayak parmaklarının ekstansiyonu ile doğrulandı.



Şekil 3.1. a) Grup 1 NMES uygulaması b) Grup 2 NMES uygulaması.

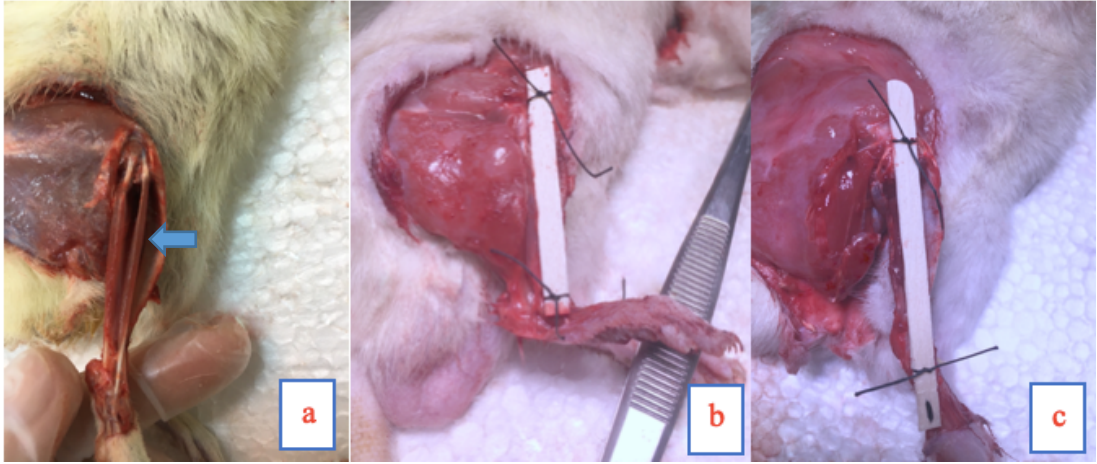
EDL hızlı kasılan bir kastır (Bkz. Tablo 3.1.). Bu nedenle elektrik stimülasyonu parametreleri; simetrik bifazik dalga formu, stimülasyon frekansı 100 Hz, atım genişliği 300 μ s, yükselme süresi 1 sn, on/off süresi 5 sn/15 sn, düşme süresi 0.5 sn olarak uygulandı (94, 95). Akım şiddeti ile kuvvet kazancının doğru orantılı olmasından dolayı, akım şiddeti standardize edildi. Akım şiddeti, gözle görülür kontraksiyon oluşturan akım miktarının iki katı olarak uygulandı. Akım şiddeti her uygulama günü yeniden değerlendirildi. Böylece güçlü bir kontraksiyon elde edildi. 10 dk uygulamadan (30 kontraksiyon) sonra yorgunluk oluşması nedeniyle maksimum istemli kontraksiyon %40'ın altına düştüğü gösterilmiştir (94). Bu nedenle, elektrik stimülasyonu günde 10 dk, haftada 3 gün, 8 hafta uygulandı.

3.4. Kas Dokularının Hazırlanması

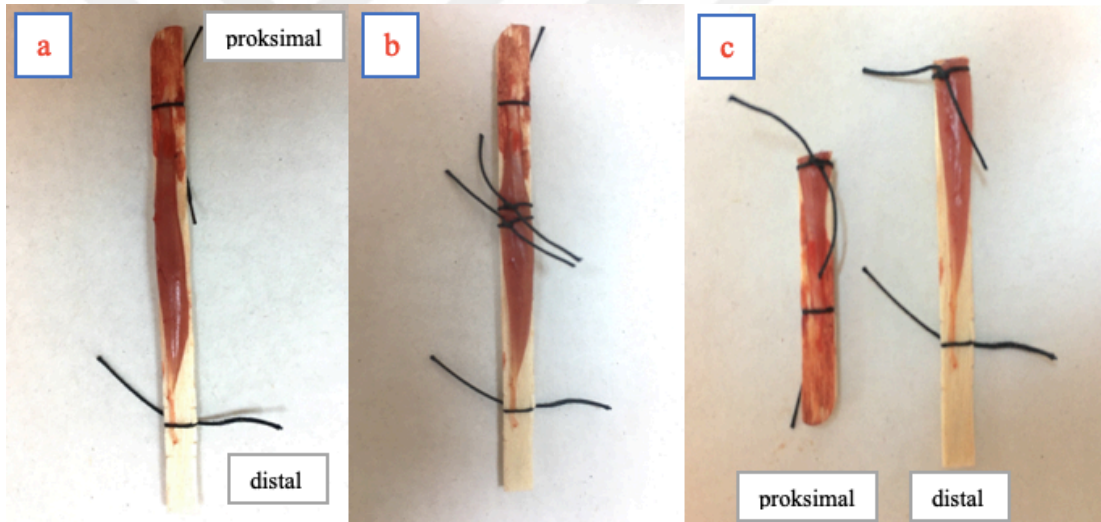
Doku toplanmadan önce sıçanlara ksilazin/ketamin kombinasyonu (10/90 mg/kg) intramusküler anestezi uygulandı. Kas çıkarıldıktan sonra servikal dislokasyon ile ötenazi gerçekleştirildi.

Biyopsi ile alınan kas örneklerinde sarkomer ölçümü için küçük bir kas lifi demeti iki ipek sütur ile tahta bir çubuğa sabitlenerek çıkarılmaktadır. Liber ve ark. (96), sarkomer uzunluğu ölçümünde bu yöntem ile aldıkları biyopsi kas örneklerinde elektron mikroskobu ve in vivo laser kırınımı ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermişlerdir. Bu yöntemle dayanarak, aynı kas dokusundan iki ayrı numune elde edebilmek için bir çözüm geliştirdik.

Anestezi altında sıçanların sağ alt ekstremitelerinin anterolateral yüzeylerine suprapatellar bölgeden ayak dorsumuna kadar vertikal cilt insizyonu yapıldı. Cilt ve cilt altı dokular ekarte edilerek M. Tibialis Anterior (TA), M. Extensor Digitorum Longus (EDL) ve M. Extensor Hallucis Longus (EHL) kaslarını saran anterior krural kompartman açığa çıkarıldı. TA, EHL ve EDL'nin kas gövdeleri arasındaki kompartman bağ dokuları ayrıştırıldı. Transvers krural ligament ve krural çapraz ligament diseke edildi. TA distal tendonu takip edilerek kas çıkarıldı ve EDL kasına ulaşıldı. EDL kası çevre bağ dokulardan ayrıştırıldı. EDL proksimal tendonuna (EDL orijini: lateral femoral kondil) ulaşmak için femoral kompartmanın distali açıldı (Şekil 3.1a.). Kas, tahta bir çubuk üzerine tendon kısımlarından sütur atılarak (cerrahi ipek iplik 3/0) çubukla birlikte çıkarıldı (Şekil 3.3a.); ancak öncesinde çubuk ağırlığı ölçüldü, sonrasında kasla birlikte de ölçülerek ikisi arasındaki fark kas kütlesi olarak hesaplandı. Daha sonra kas distal (kasın 2/3'ü) ve proksimal (kasın 1/3'ü) olarak iki parçaya bölündü (Şekil 3.3c.). Bölme işlemi, 2 sütur daha atılıp, bu iki sütur arasından kas, çubukla birlikte kesilerek yapıldı (Şekil 3.3b.). Sonuçta, kasın 1/3 proksimal kısmı gluteraldehit solüsyonuna, 2/3 distal kısmı ise formaldehit solüsyonuna yerleştirildi. Grup 1 ve kontrol 1'deki kaslar çıkarılırken diz 90°, ayak bileği plantar fleksiyonda (Şekil 3.2c.); grup 2 ve kontrol 2'deki kaslar için ise diz ve ayak bileği 90° de (Şekil 3.2b.) süturlanarak çıkarıldı. Kasın tahta çubuk üzerine sütur ile bağlanarak çıkarılması sayesinde kasın boyu değişmeden dokunun fiksasyonuna olanak sağlandı.



Şekil 3.2. EDL kasının çıkarılması: a) çevre dokulardan dissekte edilmiş EDL kası (Ok ile gösterilmiştir.) b) grup 2 EDL kasının çıkarılma pozisyonu (diz-ayak bileği 90°) c) grup 1 EDL kasının çıkarılma pozisyonu (diz 90°, ayak bileği 170°).



Şekil 3.3. Kas boyu stabil tutularak EDL kasının iki numuneye ayrılması: a) Tahta çubukla birlikte çıkarılan EDL kası b) İki suture atıldı c) İki suture arasından kesilerek ayrıldı.

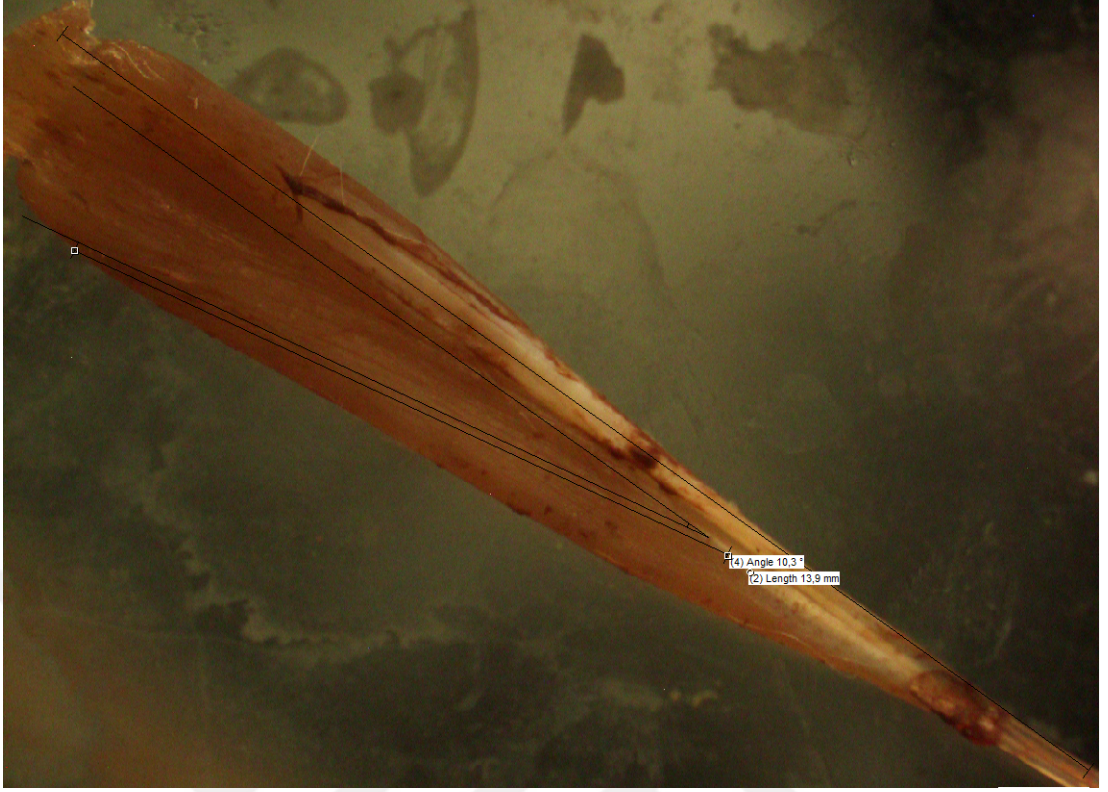
TEM görüntüleme için fiksasyon (+4 derecede) %4'lük Gluteraldehit'te (0.1 M Sörensen Fosfat Tamponunda hazırlanmış) 2 saat bekletilerek yapıldı. Streo-mikroskopik görüntüleme için doku tespiti tamponlu nötral formalin solüsyonu ile yapıldı. Solüsyon hazırlanırken 0,4 gr Na-phosphate monobasic (NaH_2HPO_4) ve 0,65 gr Na-phosphate dibasic (Na_2HPO_4) 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Sonrasında hazırlanan solüsyondan 90 ml alınıp üzerine 10 ml %37-40 formalin eklenerek %10 tamponlu nötral formalin elde edildi.

3.5. Mimari Analizler

Kas kütlesi ölçümü için öncelikle kullanılacak tahta çubuk, uygun uzunlukta kesilip hassas terazi (Denver Instrument TP-303, 0,001 gr hassasiyet) ile tartıldı. Kas, tahta çubuk ile çıkarıldıktan sonra da hassas terazi ile tartılarak ikisi arasındaki fark kas kütlesi olarak kaydedildi.

Kas uzunluğu ölçümünde kasın origo ve insertio bölgelerinde kas liflerinin en yoğun olduğu noktalar arası mesafe cetvel ile ölçüldü.

Lif uzunluğu ve pennasyon açısı ölçümleri stereo zoom mikroskop ile yapıldı. Stereo zoom araştırma mikroskobuna (Olympus SZX-7 Zoom), dijital kamera sistemi (Olympus DP26) takılarak alınan görüntüler, bilgisayar yazılımına (Olympus cellSens Imaging Software) aktarılıp 0,8X büyütülerek fotoğrafları çekildi. Ölçümler yazılım üzerinde yapıldı. Kasın medial, orta ve lateral kısımlarında yapılan pennasyon açısı ve lif uzunluğu ölçümlerinde istatistiksel olarak bir fark olmadığı gösterilmiştir (97). Kellis ve ark. (98) ise biceps femoris ve semitendinosus kaslarının, kas uzunluğunun %20, %40, %60 ve %80'inine denk gelen mesafelerinde pennasyon açısı, lif uzunluğu ve kas kalınlığını ölçmüşlerdir. Kasın longitudinal olarak farklı bölgelerinde mimari parametrelerin değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu nedenle, pennasyon açısı ve lif uzunluğu ölçümleri, distal tendinomuskuler bileşkeye kas uzunluğunun %20'sine eşit olacak mesafe uzaklıktan yapıldı (Şekil 3.4.). Distal tendon ile yüzeysel kas fasikülü arasındaki açı 2 boyutlu olarak ölçülerek pennasyon açısı olarak kaydedildi. Distal aponevrozdaki başlangıç noktasından proksimal aponevroza kadar kas fasikülü takip edilerek ölçüldü ve lif uzunluğu olarak kabul edildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Lif uzunluğu ve pennasyon açısı ölçümleri.

Kas ve lif uzunluğu, kasla ilişkili eklem farklı açısal değerlerinde değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle kas fiksasyonu sırasında pozisyonlama nedeniyle varyasyonlar oluşmaktadır. Bu da yapılan çalışmalarda denekler arası veya tedavi grupları arasında karşılaştırmaları zorlaştırmaktadır. Varyasyonları elimine etmek için standart prosedür olarak standart bir sarkomer uzunluğu ile ölçülen kas uzunluğu ve lif uzunluğu değerleri normalize edilmektedir. Felder ve ark. (99), farklı eklem açılarında (30^0 - 150^0) fikse ettikleri kaslarda yaptıkları ölçümlerde sarkomer uzunluk normalizasyonunun kullanımının %15'lik lif uzunluğu varyasyonlarının çözülmesine izin verdiğini ve hatta %10 lif uzunluğu varyasyonlarını çözmede etkili olabileceğini göstermişlerdir.

Bu çalışmada, ölçülen lif uzunluğu (Formül 3.1.) ve kas uzunluğu (Formül 3.2.) sıçanlarda optimal sarkomer uzunluğuna göre normalize edildi. Lif uzunluğu/kas uzunluğu oranı, normalize lif uzunluğunun normalize kas uzunluğuna oranı alınarak hesaplandı (90).

$$L_f = L'_f \times (2,4 \div L'_s) \quad (3.1.)$$

$$L_m = L'_m \times (2,4 \div L'_s) \quad (3.2.)$$

L_m : normalize kas uzunluğu, L'_m : ölçülen kas uzunluğu L_f : normalize lif uzunluğu, L'_f : ölçülen lif uzunluğu L'_s : ölçülen sarkomer uzunluğu, 2,4: sıçanlar için optimal sarkomer uzunluğu (100).

Fizyolojik enine kesit alanı (FEKA) (101) ve sarkomer sayısı (SN) (90) aşağıdaki formüller ile hesaplandı.

$$SN = L'_f \div L'_s \quad (3.3.)$$

$$FEKA (mm^2) = \frac{M (g) \times \cos Q}{p (g/mm^3) \times L_f (mm)} \quad (3.4.)$$

L'_f : ölçülen lif uzunluğu L'_s : ölçülen sarkomer uzunluğu L_f : normalize lif uzunluğu, M : kas kütlesi, $\emptyset$: pennasyon açısı, p =kas yoğunluğu (1.0597 g/cm³)

Mendez ve Keys (102), kas yoğunluğunu fikse edilmemiş tavşan ve köpek dokularından elde etmişlerdir. Kas yoğunluğunu 1,0597g/cm³ olarak bildirmişlerdir. Ward ve Lieber (103), çalışmalarında fiksasyon uygulanan kasın yoğunluğunun değiştiğini göstermişlerdir. Yoğunluk, kütle/hacim ($P=M/V$) formülü ile bulunur. Literatürde kas mimarisi çalışmalarında kas, %10'luk formalin solüsyonunda fikse edilip, tamponlu salin içinde depolanmaktadır. Formalinde kas dehidre olurken, tamponlu salin içinde tekrar rehidre olmaktadır. Bu nedenle kas örneklerinin hacmi ve dolayısıyla yoğunluğu etkilenmektedir. *Bu nedenle yapılan FEKA hesaplamalarının gerçeği yansıtmadığını belirtmişlerdir.* %10 formalinde daldırma fiksasyonu kullanan kas mimarisi çalışmalarında, kas yoğunluğu için 1,112 g/cm³ değerinin kullanılmasını önermişlerdir. 1,0597 g/cm³ değerini kullananların, FEKA'yı %5 fazla tahmin ediyor olduklarını belirtmişlerdir.

Ancak bizim çalışmamızda kas dokusuna fiksasyon uygulanmadan çıkarılır çıkarılmaz tartıldığı için dehidre olmadan yani hacimsel bir değişiklik olmadan kas kütlesi hesaplanmaktadır. Bu nedenle FEKA hesaplamalarında kas yoğunluğunu 1,0597g/cm³ olarak kullandık. Friden ve ark. (104), elektron mikroskopik çalışmalarında eksentrik egzersiz sonrası sarkomer çizgili band paternini 1 saat, 3 gün

ve 6 gün sonra gözlemlenmişler ve liflerin %32, %52, %12'sinde bozulma olduğunu göstermişlerdir. Çalışma protokolümüzde, fiksasyon sırasındaki varyasyonları elimine etmek için kas lifi ve kas uzunluklarının normalizasyonunda sarkomer uzunluğu ölçümleri önemlidir. Uzun kas uzunluğunda uygulanan NMES ile kas liflerinin germeye maruz kalmasından dolayı sarkomer uzunluğu ölçümlerinde elektron mikroskopik görüntülemeye benzer bir görünüm olabileceği düşünüldü. Bu nedenle ölçümler, NMES uygulaması sonlandırıldıktan 1 hafta sonra yapıldı.

3.6. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Protokolü

Çıkarılan kaslar transmisyon elektron mikroskobu ile (ZEISS-LEO 906E TEM) numunelerin hazırlanması (doku takibi) ve görüntülenmesi için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskop Görüntü Analiz Ünitesine (TEMGA) gönderildi. Doku takibi aşağıdaki gibi yapıldı.

3.6.1. Fiksasyon (+4 Derecede)

Dokular %4'lük Gluteraldehit'te (0,1 M Sörensen Fosfat Tamponunda (SFT) hazırlanmış) 2 saat bekletilerek tespit edildi.

3.6.2. Yıkama (Oda ısısı, rotatorda)

Tespit edilen dokular 0,1 M SFT ile oda ısısında rotatorda 3x10 dakika yıkandı.

3.6.3. Osmiyum Tetraoksit (OsO₄) Fiksasyonu (Oda ısısı, rotatorda)

Yıkanan dokular %1'lik SFT'nda hazırlanmış OsO₄ fiksatifi ile oda ısısında rotatorda 2 saat ikinci kez tespit edildi.

3.6.4. Yıkama (Oda ısısı, rotatorda)

OsO₄ ile ikinci kez tespit edilen dokular 0,1 M SFT ile 3x10 dakika yıkandı.

3.6.5. Dehidratasyon (+4 derecede)

İkinci yapılan tespitten sonra yıkanmış olan dokular dehidratasyon için tedricen artan dereceli alkol serilerinden geçirildi:

%30 etanol	3x10 dakika.
%50 etanol	3x10 dakika.
%70 etanol	3x10 dakika.

3.6.6. En Blok Staining (+4 derecede):

Dehidratasyondan sonra dokular %75'lik etanol ile hazırlanmış %1'lik URANİL ASETAT solüsyonunda 1 saat bekletilerek boyandı.

3.6.7. Dehidratasyon (+4 derecede) (devam)

İkinci kez tedricen artan alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı:

%80 etanol	3x10 dakika.
%90 etanol	3x10 dakika.
%96 etanol	3x10 dakika.
%100 etanol	3x10 dakika.

3.6.8. Ara Çözelti

Dehidratasyon işlemi sonrasında dokular Propilen Oksit+(Araldit Ana Karışımı+%2 oranında Hızlandırıcı BDMA) (1:1 oranında) hazırlanan çözelti içerisinde 4 saat boyunca rotatorda döndürüldü.

3.6.9. Gömme

Gömme işlemine geçmeden önce parçalar kürdan yardımı ile şişelerden çıkarıldı ve süzgeç kâğıdı üzerinde yuvarlanarak fazla araldit alındı. Ayrı bir şişe içindeki bu karışıma parçalar alınıp, oda ısısında 1 gece rotatorda döndürüldü ve araldite gömüldü. Gömme işleminin ardından 60 derecede 48 saat bekletildi.

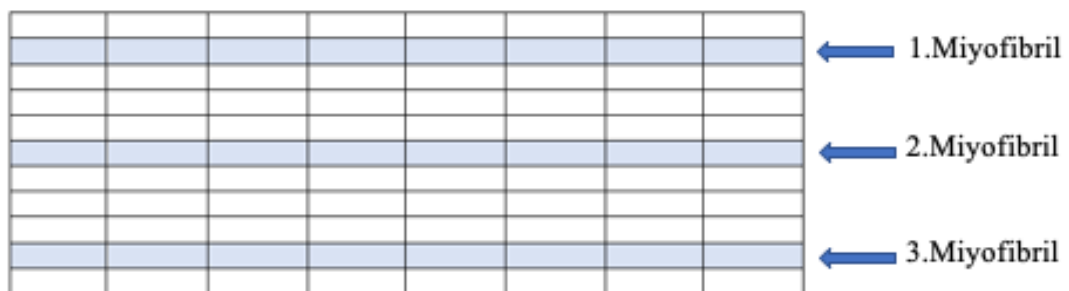
Numuneler doku takibi işlemlerinden geçirildikten sonra bloklandı, sonrasında ultramikrotom cihazında ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik kesitler alınıp gridler üzerine yerleştirildi. Gridler üzerindeki kesitler kontrastlandıktan sonra TEM de (Zeiss 9EM TEM) incelendi.

Elektron tabancasında üretilen elektron ışık demeti ince numuneden geçerek altta floresan ekran üzerine düşürüldü ve orada siyah beyaz bir görüntü oluşturuldu.

Görüntüler dijital CCD kamera aracılığıyla monitöre aktarılıp canlı olarak monitörden inceleme yapıp görüntü alındı.

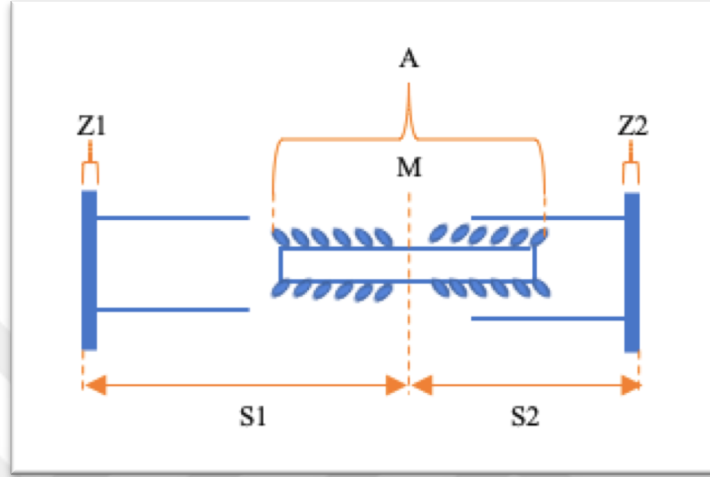
3.7. Sarkomer Özellikleri

Sarkomer uzunluğu ölçümleri TEM ile yapılan dijital görüntüler üzerinden yapıldı. Görüntüler ImageJ yazılımına aktarılarak ölçümler gerçekleştirildi. Ardışık iki Z çizgisi arası mesafe ölçülerek sarkomer uzunluğu olarak kabul edildi. Aynı kas dokusundan alınan kesitlerde tüm sarkomerlerin uzunlukları eşit değildir. Gerilim altında zayıf olan sarkomerler daha fazla uzarken, güçlü sarkomerler kısalma eğilimindedirler (105). Çalışmamızda kasın gergin pozisyonunda fiksasyon uyguladığımız için kesitlerde bu eşitsizlik belirgin şekilde yaygındı. Bu nedenle, kesit görüntüsünün sağ, orta ve sol tarafından olmak üzere üç miyofibrilin ardışık sekiz sarkomerinin uzunluğu ölçüldü (Şekil 3.5.). Toplam 24 sarkomer uzunluğu ölçümünün ortalaması alınarak sarkomer uzunluğu olarak kaydedildi.



Şekil 3.5. Sarkomer uzunluğunun hesaplanması. Her bir kutu bir sarkomer olarak sembolize edildi. Mavi ile işaretlenen sarkomer serileri miyofibrilleri gösterir. İşaretlenen sarkomerlerin uzunluklarının ortalaması alınarak sarkomer uzunluğu olarak kabul edildi.

Ayrıca, A bandı genişliği (A), uzun yarı sarkomer (S1), kısa yarı sarkomer (S2) uzunlukları ve uzun yarı sarkomerin Z çizgisi (Z1), kısa yarı sarkomerin Z çizgisi (Z2) kalınlıkları ölçüldü (Şekil 3.6.). Ayrıca bu görüntüler üzerinden kas hasarı bulguları (Z çizgisi, sarkoplazmik retikulum, T tübülü, mitokondri yapıları) da değerlendirildi.



Şekil 3.6. Sarkomere ait yapıların ölçülmesi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler SPSS yazılımı versiyon 26 (IBM, Armonk, NY 10504-1722, ABD) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Ölçümler normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri olarak, verilerin normal dağılım göstermediği durumlarda ise ortanca (minimum, maksimum) değerleri olarak ifade edildi. Normal dağılım gösteren mimari ve sarkomer değişkenleri gruplar arasında Student's t-testi ile karşılaştırıldı; değişkenler normal dağılım göstermiyorsa Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların (S1-S2, Z1-Z2) sarkomer özelliklerini analiz etmek için normal dağılımlı değişkenler için Eşleştirilmiş Student t-testi ve normal dağılımlı olmayan değişkenler için Wilcoxon Testi kullanıldı. Korelasyonlar, grupların sarkomer özellikleri için test edildi. Normal dağılım gösteren değişkenler için Pearson korelasyon analizi, normal dağılmayan değişkenler için Spearman testi kullanıldı. Korelasyon katsayıları ise şu şekilde yorumlandı: 0,05-0,3=düşük veya önemsiz ilişki; 0,3-0,4=düşük orta derecede ilişki; 0,4-0,6=orta derecede ilişki; 0,6-0,7=iyi derecede ilişki; 0,7-0,75=çok iyi derecede ilişki; 0,75-

1=mükemmel ilişki (106). Yarı sarkomer uzunlukları ile Z çizgisi arasındaki ilişkinin incelenmesinde basit doğrusal regresyon analizi yöntemi kullanıldı (S1-Z1, S2-Z2). Tüm istatistikler için istatistiksel anlamlılık seviyesi $<0,05$ olarak belirlendi.



4. BULGULAR

4.1. Kas Mimarisi

Tedavi gruplarının kas mimarisi özelliklerinin sonuçları Tablo 4.1.'de sunuldu. Grup 1'de Kontrol 1'e göre kas uzunluğu ($p=0,035$), lif uzunluğu ($p=0,04$) ve sarkomer sayısı ($p=0,03$) artarken, pennasyon açısı ($p=0,001$) azaldı. Sıçan kütlesi ($p=0,58$), kas kütlesi ($p=0,9$), fizyolojik enine kesit alanı ($p=0,76$), Lf/Lm oranı ($p=0,9$) ve sarkomer uzunluğunda ($p=0,15$) ise fark bulunmadı. Grup 2'de Kontrol 2'ye göre lif uzunluğu ($p=0,004$) ve sarkomer sayısı ($p=0,049$) artarken; kas kütlesi ($p=0,02$), pennasyon açısı ($p=0,037$), fizyolojik enine kesit alanı ($p=0,005$), sarkomer uzunluğu ($p=0,049$) azaldı. Sıçan kütlesi ($p=0,78$), kas uzunluğu ($p=0,79$) ve Lf/Lm oranı ($p=0,16$) arasında ise fark bulunmadı.

Tablo 4.1. Tedavi gruplarının EDL kasına ait mimari özelliklerinin sonuçları.

	Grup 1	Kontrol 1	p ^d	d	Grup 2	Kontrol 2	p ^e	d
M_s (gr)^a	368,5 (53,9)	349,5 (59,7)	0,58	0,34	362,5 (52,7)	373,7 (79,1)	0,78	0,16
M_m (mg)^a	183,7 (33,4)	181,0 (38,3)	0,90	0,08	177,3 (20,6)	210,8 (21,2)	0,02^c	1,57
L_m (cm)^b	3,56 (3,03- 4,11)	2,89 (2,16- 3,75)	0,035^c	1,01	3,52 (2,90- 3,83)	3,28 (3,19- 3,37)	0,79	0,41
L_f (mm)^b	14,10 (12,1- 20,2)	11,64 (8,7- 14,1)	0,04^c	1,17	13,2 (11,2- 15,7)	11,23 (11,2- 12,3)	0,004^c	1,61
PA (°)^a	7,21 (0,43)	9,67 (0,40)	0,001^c	5,92	7,51 (0,89)	9,28 (0,07)	0,037^c	2,8
FEKA (cm²)^b	0,13 (0,07, 0,16)	0,15 (0,13- 0,16)	0,76	0,96	0,12 (0,1- 0,14)	0,15 (0,13- 0,2)	0,005^c	1,9
L_f/L_m^a	0,41 (0,04)	0,41 (0,02)	0,9	0,11	0,38 (0,04)	0,36 (0,01)	0,16	0,88
L_s (μm)^b	2,50 (1,87, 2,77)	2,87 (2,24- 3,68)	0,15	1,04	2,60 (2,32- 2,90)	2,71 (2,70- 2,71)	0,049^c	0,79
SS^a	6070 (1232)	4607 (721)	0,03^c	1,45	5476 (964)	4904 (322)	0,049^c	1,29

d: etki büyüklüğü; M_s: sıçan kütlesi; M_m: kas kütlesi; L_m: kas uzunluğu; L_f: fasikül uzunluğu; PA: pennasyon açısı; FEKA: fizyolojik enine kesit alanı; L_s: ölçülen sarkomer uzunluğu; SS: sarkomer sayısı.

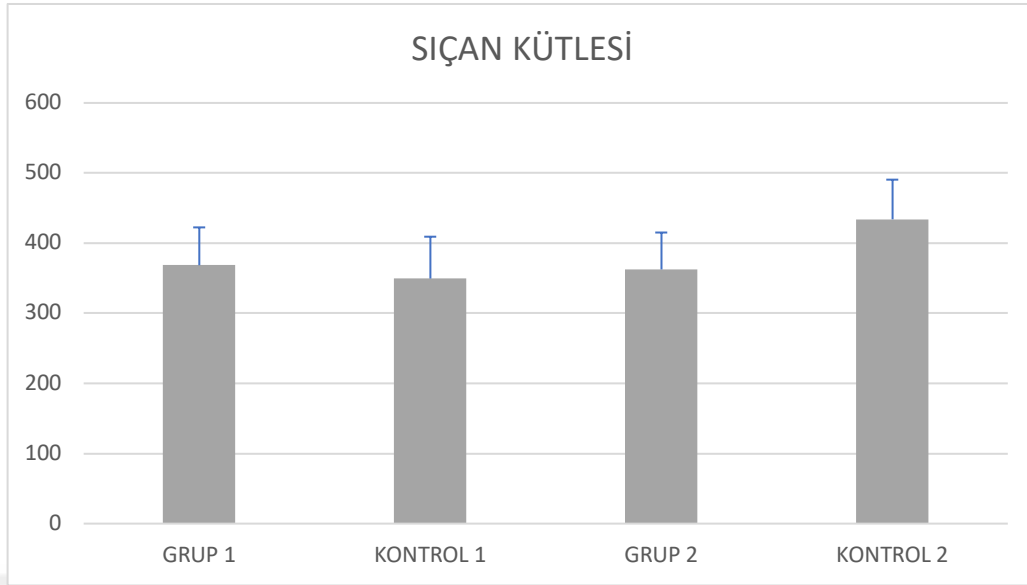
^a Normal dağılılan değişken. Ortalama (Standart Sapma) şeklinde sunuldu.

^b Normal dağılmayan değişken. Ortanca (Minimum-Maksimum) şeklinde sunuldu.

^c p<0,05.

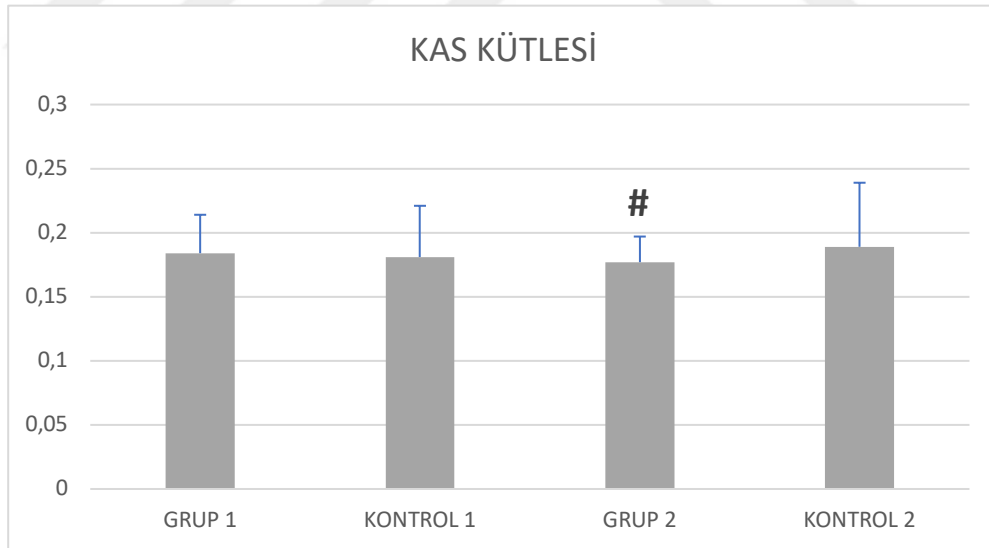
^d Grup 1 ve Kontrol 1 karşılaştırıldı.

^e Grup 2 ve Kontrol 2 karşılaştırıldı.



Şekil 4.1. Tedavi gruplarının sıçan kütleleri sonuçları.

Tedavi gruplarının sıçan kütleleri karşılaştırıldı (Şekil 4.1.). G1 (368,5±53,99 gr) ve K1 (349,5±59,71 gr) arasında ($p=0,58$), G2 (362,5±52,67 gr) ve K2 (434,0±56,57 gr) arasında ($p=0,78$), G1 ve G2 arasında ($p=0,85$) fark bulunmadı.

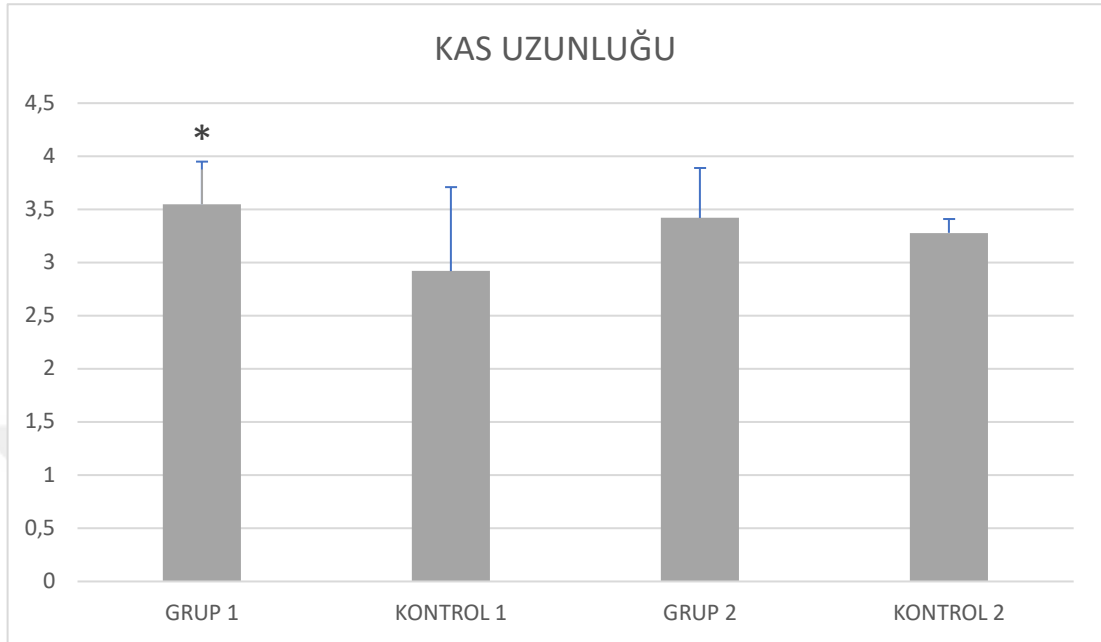


Şekil 4.2. Tedavi gruplarının kas kütlesi sonuçları.

$p<0,05$, Kontrol 2'den fark.

Tedavi gruplarının kas kütleleri karşılaştırıldı (Şekil 4.2.). G1 (0,184 ± 0,03 mg) ve K1 (0,181 ± 0,04 mg) arasında fark bulunmadı ($p=0,9$). G2'deki (0,177 ± 0,02 mg)

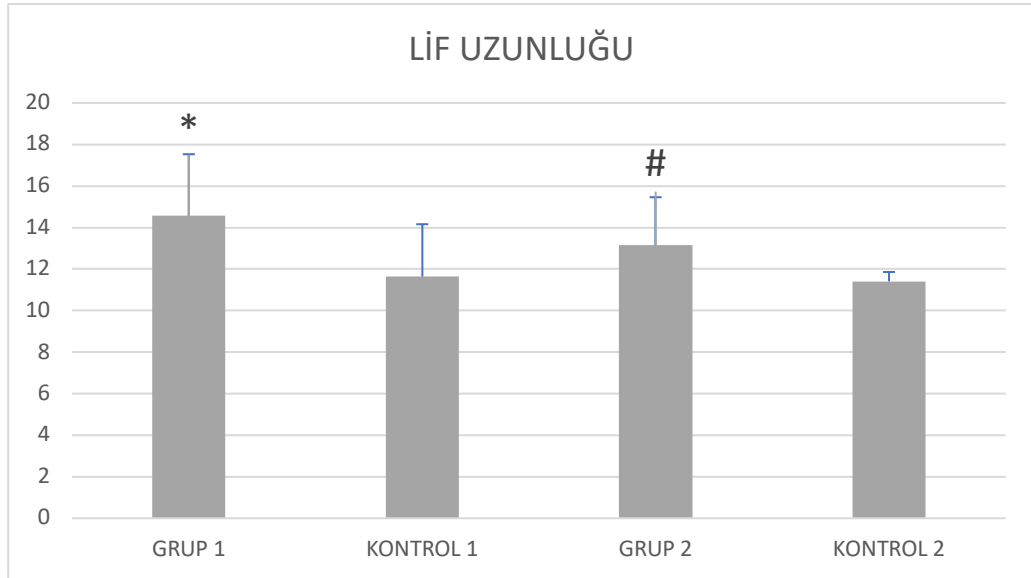
kas kütlesi K2'den ($0,189 \pm 0,05$ mg) daha az bulundu ($p=0,02$). G1 ve G2 arasında da fark bulunmadı ($p=0,7$).



Şekil 4.3. Tedavi gruplarının kas uzunluğu ölçümlerinin sonuçları.

* $p<0,05$, Kontrol 1'den fark.

Tedavi gruplarının kas uzunlukları karşılaştırıldı (Şekil 4.3.). G1'deki ($3,55 \pm 0,40$ cm) kas uzunluğu K1'den ($2,92 \pm 0,79$ cm) daha fazlaydı ($p=0,035$). G2 ($3,42 \pm 0,47$ cm) ve K2 ($3,28 \pm 0,13$ cm) gruplarının kas uzunlukları arasında fark yoktu ($p=0,79$). G1 ve G2 arasında da fark yoktu ($p=0,87$).

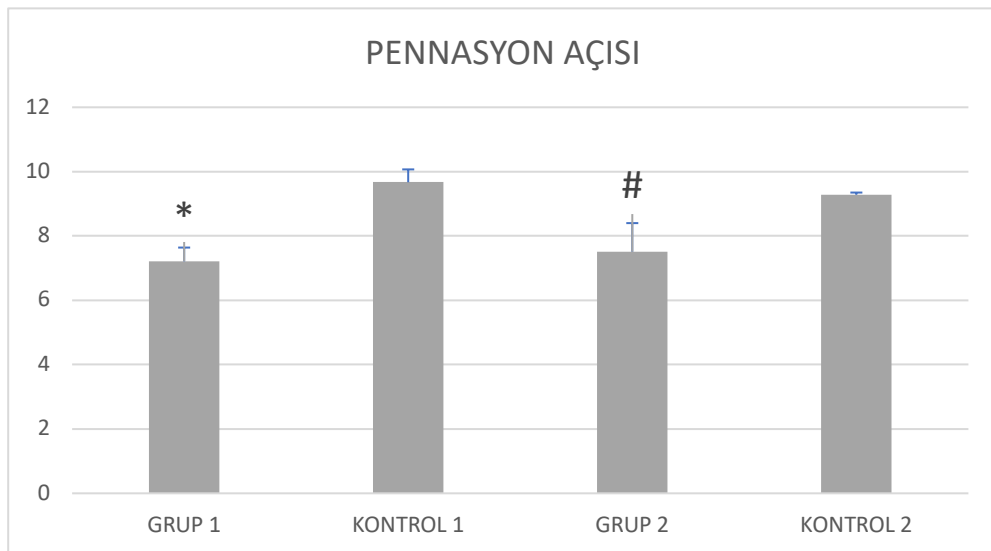


Şekil 4.4. Tedavi gruplarının lif uzunluğu ölçümlerinin sonuçları.

* $p < 0,05$, Kontrol 1'den fark.

$p < 0,05$, Kontrol 2'den fark.

Tedavi gruplarının lif uzunlukları karşılaştırıldı (Şekil 4.4.). G1'deki ($14,57 \pm 2,96$ mm) lif uzunluğu K1'den ($11,64 \pm 2,52$ mm) daha uzun bulundu ($p = 0,037$). G2'deki ($13,14 \pm 2,32$ mm) lif uzunluğu K2'den ($11,78 \pm 0,77$ mm) daha uzundu ($p = 0,004$). G1 ve G2 arasında fark bulunmadı ($p = 0,42$).

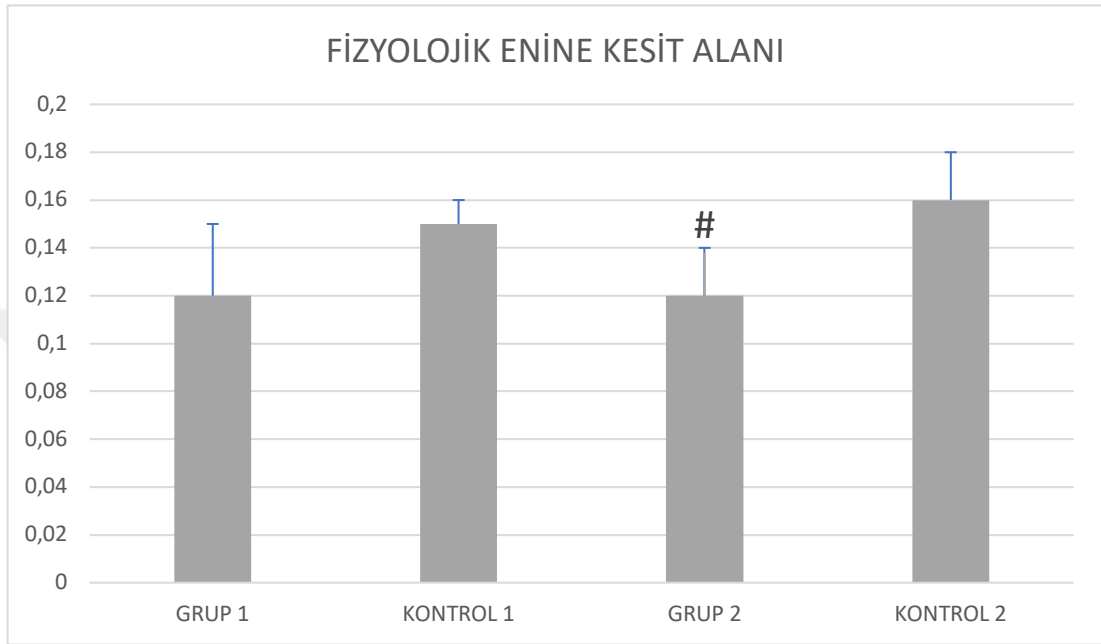


Şekil 4.5. Tedavi gruplarının pennasyon açısı ölçümlerinin sonuçları.

* $p < 0,05$, Kontrol 1'den fark.

$p < 0,05$, Kontrol 2'den fark.

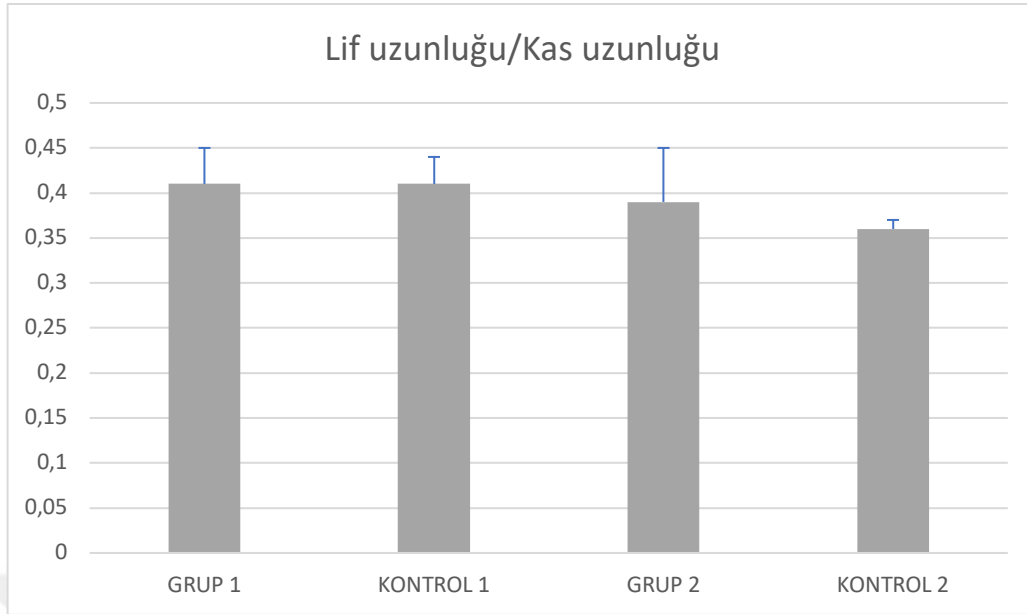
Tedavi gruplarının pennasyon açıları karşılaştırıldı (Şekil 4.5.). G1'deki ($7,21 \pm 0,43$) pennasyon açısı K1'den ($9,67 \pm 0,40$) daha dar bulundu ($p < 0,001$). G2'deki ($7,51 \pm 0,89$) pennasyon açısı da K2'den ($9,28 \pm 0,07$) daha dar bulundu ($p = 0,37$). G1 ve G2 arasında fark bulunmadı ($p = 0,47$).



Şekil 4.6. Tedavi gruplarının fizyolojik enine kesit alanı ölçümlerinin sonuçları.

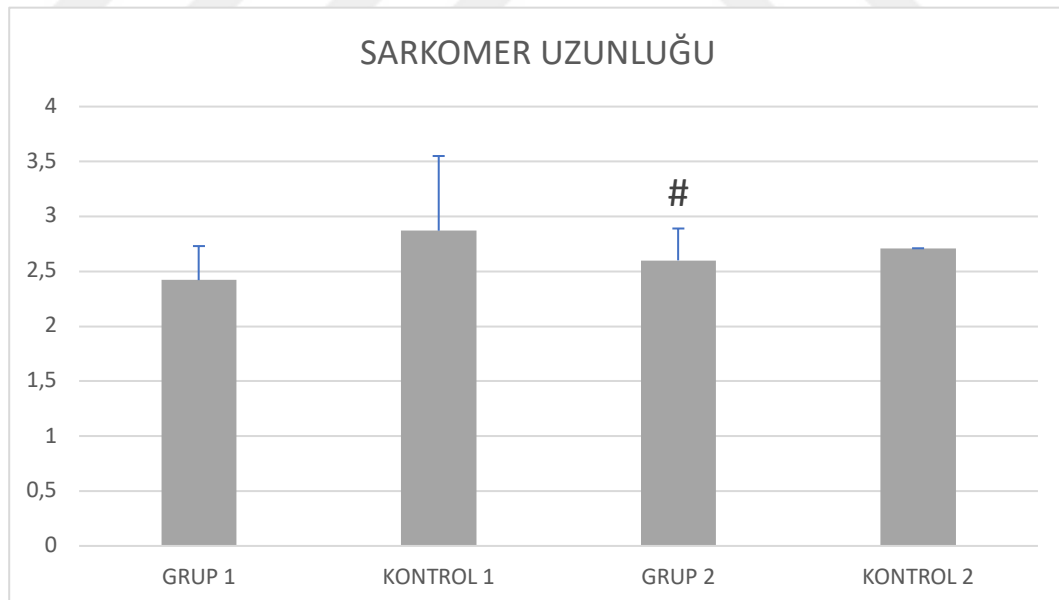
$p < 0,05$, Kontrol 2'den fark.

Tedavi gruplarının fizyolojik enine kesit alanı ortalamaları karşılaştırıldı (Şekil 4.6.). G1 ve K1'de fizyolojik enine kesit alanları arasında fark yoktu ($p = 0,76$). G2'de ($0,12 \pm 0,02 \text{ cm}^2$) fizyolojik enine kesit alanı K2'den ($0,16 \pm 0,02 \text{ cm}^2$) daha az bulundu ($p = 0,005$). G1 ve G2 arasında fark yoktu ($p = 1,0$).



Şekil 4.7. Tedavi gruplarının lif uzunluğu/kas uzunluğu oranı sonuçları.

Tedavi gruplarının lif uzunluğu/kas uzunluğu oranı karşılaştırıldı (Şekil 4.7.). G1 ($0,41 \pm 0,04$) ve K1 ($0,41 \pm 0,03$) arasında ($p=0,9$), G2 ($0,39 \pm 0,06$) ve K2 ($0,36 \pm 0,01$) arasında ($p=0,16$), G1 ve G2 arasında ($p=0,34$) fark bulunmadı.

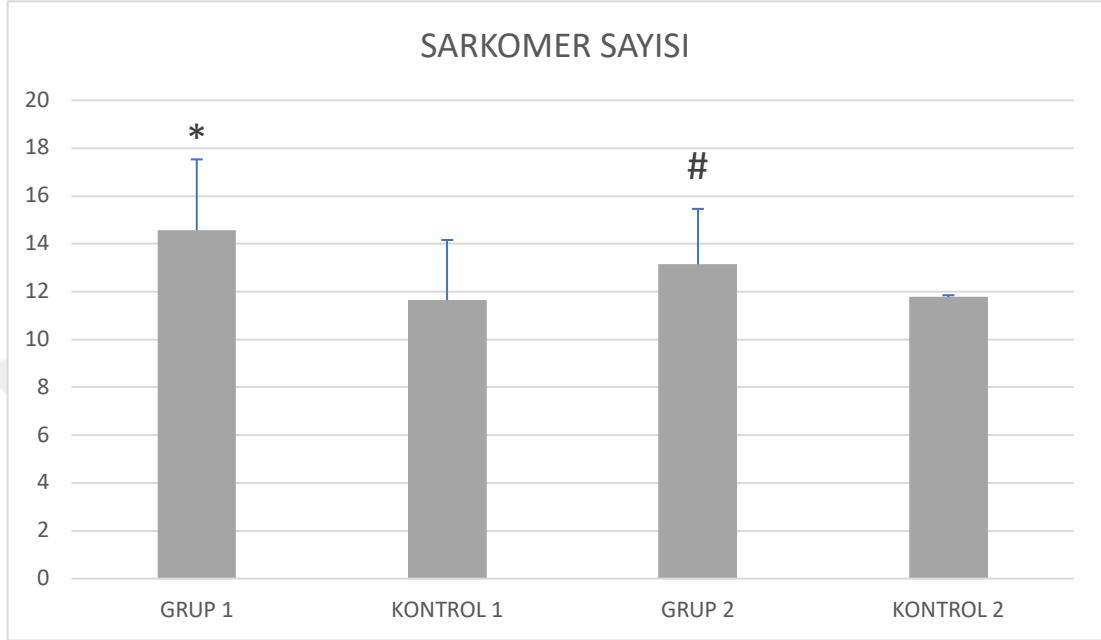


Şekil 4.8. Tedavi gruplarının sarkomer uzunluğu ölçümlerinin sonuçları.

$p<0,05$, Kontrol 2'den fark.

Tedavi gruplarının sarkomer uzunluğu ortalamaları karşılaştırıldı (Şekil 4.8.). G1 ($2,42 \pm 0,31 \mu\text{m}$) ve K1'de ($2,87 \pm 0,68 \mu\text{m}$) sarkomer uzunlukları arasında fark

bulunmadı ($p=0,15$). G2'deki ($2,60 \pm 0,29 \mu\text{m}$) sarkomer uzunluğu K2'den ($2,71 \pm 0,00 \mu\text{m}$) daha kısa bulundu ($p=0,049$). G1 ve G2 arasında fark yoktu ($p=0,13$).



Şekil 4.9. Tedavi gruplarının sarkomer sayısı sonuçları.

* $p<0,05$, Kontrol 1'den fark.

$p<0,05$, Kontrol 2'den fark.

Tedavi gruplarının sarkomer sayıları karşılaştırıldı (Şekil 4.9.). G1'deki (6070 ± 1232) sarkomer sayısı K1'den (4607 ± 1147) fazla bulundu ($p=0,016$). G2'deki (5476 ± 964) sarkomer sayısı K2'den (4904 ± 322) fazla bulundu ($p=0,033$). G1 ve G2 arasında fark yoktu ($p=0,32$).

4.2. Sarkomer Özellikleri

Tedavi gruplarının sarkomer özelliklerinin sonuçları Tablo 4.2.'de sunuldu.

Tablo 4.2. Tedavi gruplarının sarkomer özelliklerinin sonuçları.

	Grup 1	Kontrol 1	P ^d	d	Grup 2	Kontrol 2	P ^e	d
Z1 (μm)^a	0,11 (0,02)	0,13 (0,01)	0,03^c	1,26	0,12 (0,02)	0,12 (0,03)	0,74	0,00
Z2 (μm)^a	0,08 (0,02)	0,11 (0,01)	0,001^c	1,90	0,09 (0,03)	0,10 (0,01)	0,22	0,71
P^g	0,001^c	0,001^c			0,01^c	0,001^c		
S1 (μm)^b	1,68 (1,36- 2,03)	2,37 (1,73- 2,79)	0,02^c	1,75	1,48 (1,12- 2,82)	1,99 (1,91- 2,07)	0,003^c	2,28
S2 (μm)^a	1,54 (0,18)	2,25 (0,46)	0,01^c	2,03	1,28 (0,4)	1,75 (0,32)	0,05^c	1,30
P^h	0,01^c	0,04^c			0,13	0,049^c		
A (μm)^a	1,81 (0,18)	2,19 (0,2)	0,005^c	2,36	1,52 (0,21)	1,90 (0,12)	0,003^c	0,73

d: etki büyüklüğü; S1: uzun olan yarı sarkomerin uzunluğu; S2: kısa olan yarı sarkomerin uzunluğu; Z1: uzun olan yarı sarkomerin Z çizgisi kalınlığı; Z2: kısa olan yarı sarkomerin Z çizgisi kalınlığı.

^a Normal dağılan değişken. Ortalama (Standart Sapma) şeklinde sunuldu.

^b Normal dağılmayan değişken. Ortanca (Minimum-Maksimum) şeklinde sunuldu.

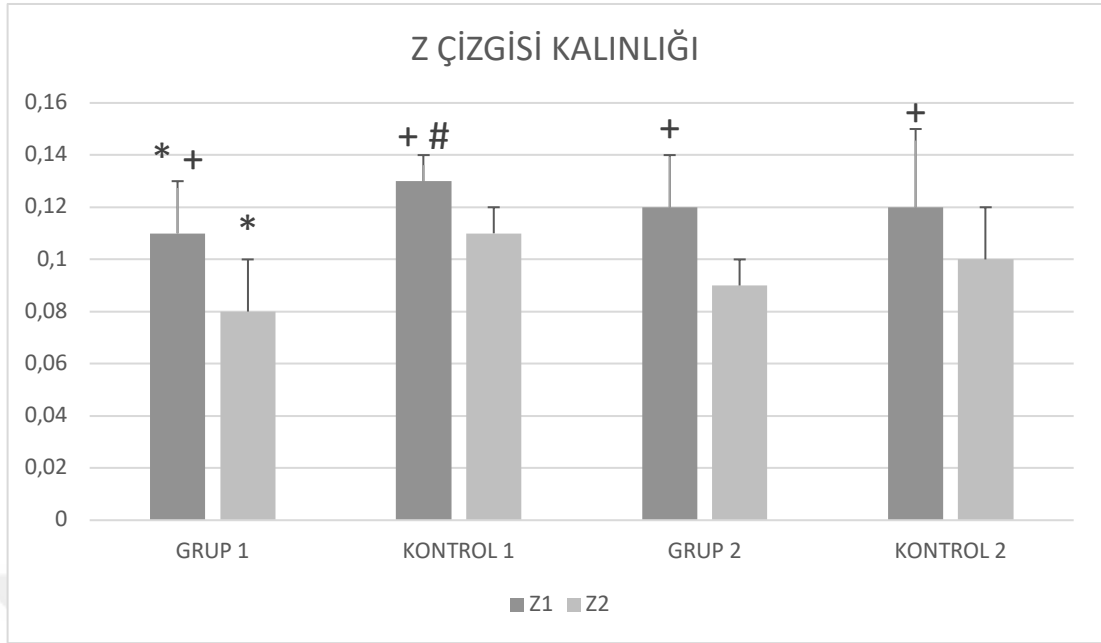
^c p<0,05.

^d Grup 1 ve Kontrol 1 karşılaştırıldı.

^e Grup 2 ve Kontrol 2 karşılaştırıldı.

^f Z1 ve Z2 karşılaştırıldı.

^g S1 ve S2 karşılaştırıldı.



Şekil 4.10. Tedavi gruplarının Z çizgisi kalınlığı ölçümlerinin sonuçları.

Z1: uzun olan yarı sarkomerin Z çizgisi kalınlığı; Z2: kısa olan yarı sarkomerin Z çizgisi kalınlığı.

* $p < 0,05$, Kontrol 1'den fark.

$p < 0,05$, Kontrol 2'den fark.

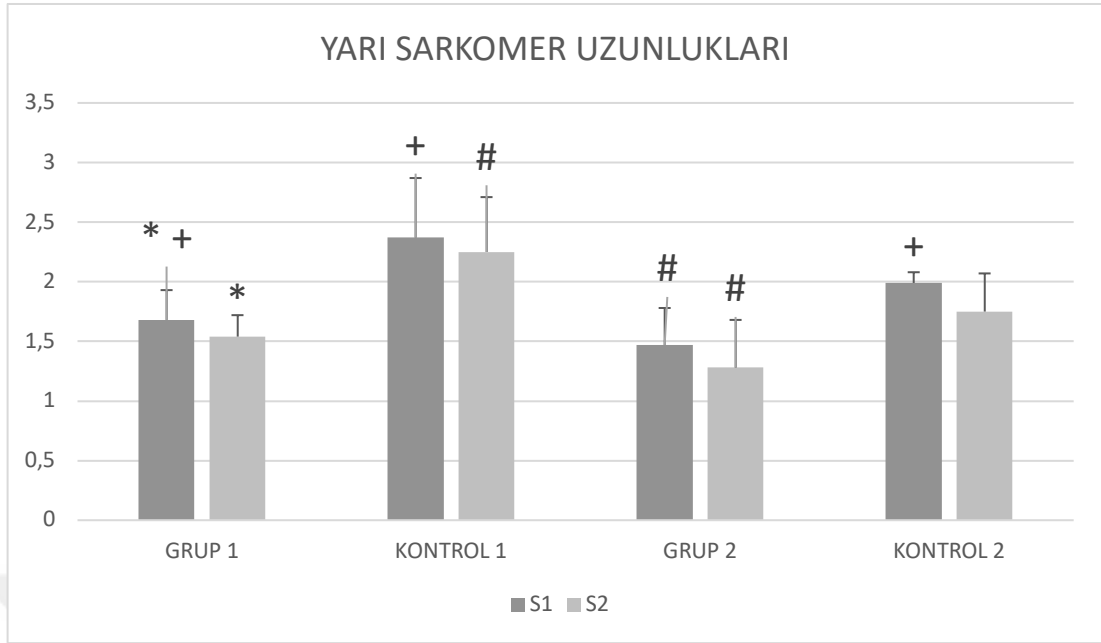
+ $p < 0,05$, Z2'den fark.

Tedavi gruplarının Z çizgisi kalınlıkları karşılaştırıldı (Şekil 4.10.). G1 ($p=0,001$), G2 ($p=0,011$), K1 ($p=0,001$) ve K2 ($p=0,001$) gruplarında Z1 çizgisi kalınlığı Z2 çizgisine göre daha kalın bulundu.

G1 grubunda ($0,11 \pm 0,02 \mu\text{m}$) Z1 çizgisi kalınlığı K1 ($0,13 \pm 0,01 \mu\text{m}$) grubuna göre dar bulundu ($p=0,031$). G2 ve K2 gruplarının Z1 çizgisi kalınlıkları arasında fark yoktu ($p=0,74$).

G1 ($0,08 \pm 0,02 \mu\text{m}$) grubunda Z2 kalınlığı K1 ($0,11 \pm 0,01 \mu\text{m}$) grubuna göre daha dar bulundu ($p=0,001$). G2 ve K2 grupları arasında Z2 çizgisi kalınlıkları arasında fark bulunmadı ($p=0,22$).

K1 grubunda Z1 çizgisi kalınlığı K2'den daha kalın bulundu ($p=0,012$). K1 ve K2 gruplarının Z2 çizgisi kalınlıkları arasında fark yoktu ($p=0,35$).



Şekil 4.11. Tedavi gruplarının yarı sarkomer uzunluklarının sonuçları.

S1: uzun olan yarı sarkomerin uzunluğu; S2: kısa olan yarı sarkomerin uzunluğu.

*p<0,05, Kontrol 1'den fark.

p<0,05, Kontrol 2'den fark.

+ p<0,05, S2'den fark.

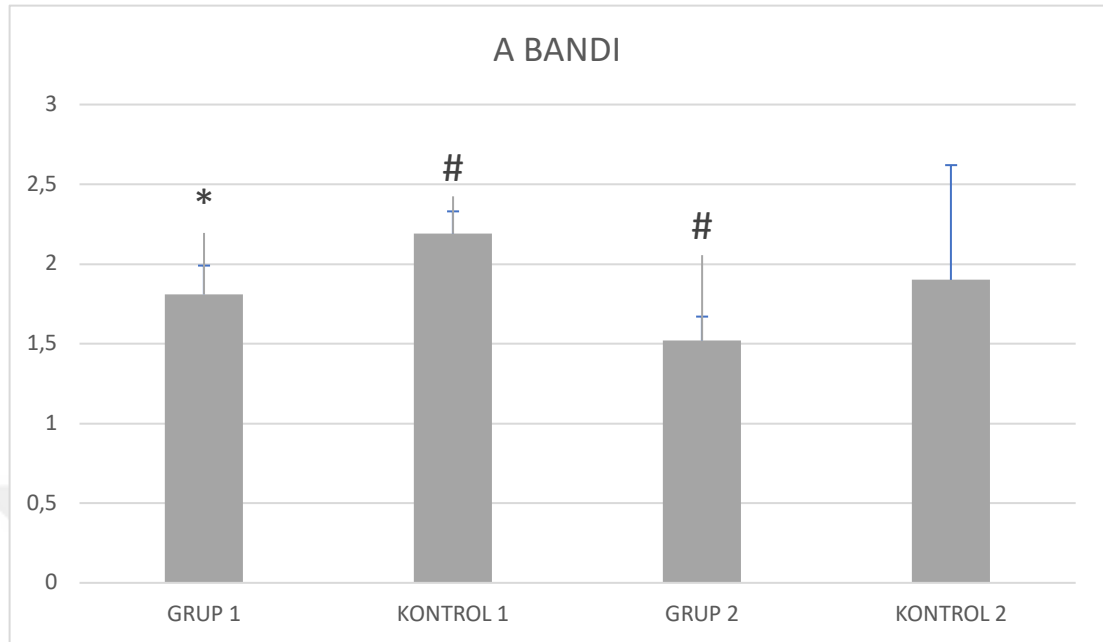
Tedavi gruplarının yarı sarkomer uzunlukları karşılaştırıldı (Şekil 4.11.). G1 (p=0,011), K1 (p=0,035) ve K2 (p=0,049) gruplarında yarı sarkomer uzunlukları, S1, S2'ye göre daha uzundu. G2'de ise S1 ve S2 uzunlukları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı (p=0,131).

G1 grubundaki (1,54±0,18 μm) S1 uzunluğu K1 (2,37±0,5 μm) grubuna göre kısa bulundu (p=0,013). G2 grubundaki (1,47±0,31 μm) S1 uzunluğu K2 grubuna (1,99±0,09 μm) göre kısa bulundu (p=0,003).

G1'deki (1,54±0,18 μm) S2 uzunluğu, K1'dekine (2,25±0,46) μm göre daha kısaydı (p=0,001). G2'deki (1,28±0,40 μm) S2 uzunluğu K2'dekine (1,75±0,32 μm) göre daha kısa bulundu (p=0,003).

K1 ve K2 gruplarının S1 uzunlukları arasında fark yoktu (p=0,10). K1'deki S2 uzunluğu K2'dekine göre daha kısaydı (p=0,05).

G1 ve G2 gruplarının S1 uzunlukları arasında fark yoktu (p=0,33). G1 ve G2 gruplarının S2 uzunlukları arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark yoktu (p=0,18).



Şekil 4.12. A bandı genişliği ölçümlerinin sonuçları.

*p<0,05, Kontrol 1'den fark.

#p<0,05, Kontrol 2'den fark.

Tedavi gruplarının A bandı genişlikleri karşılaştırıldı (Şekil 4.12.). G1'deki ($1,81 \pm 0,18 \mu\text{m}$) A bandı genişliği K1'den ($2,19 \pm 0,14 \mu\text{m}$) dar bulundu ($p=0,002$). G2 ($1,52 \pm 0,15 \mu\text{m}$) grubunun A bandı genişliği K2'den ($1,90 \pm 0,72 \mu\text{m}$) daha dar bulundu ($p<0,001$). K1 ($2,19 \pm 0,14 \mu\text{m}$) grubundaki A bandı genişliği K2 ($1,90 \pm 0,72 \mu\text{m}$) grubundan daha geniş bulundu ($p=0,011$).

S1 uzunluğu ve Z1 çizgisi kalınlığı arasında orta düzeyde, pozitif korelasyon bulundu ($r=594$, $p=0,007$).

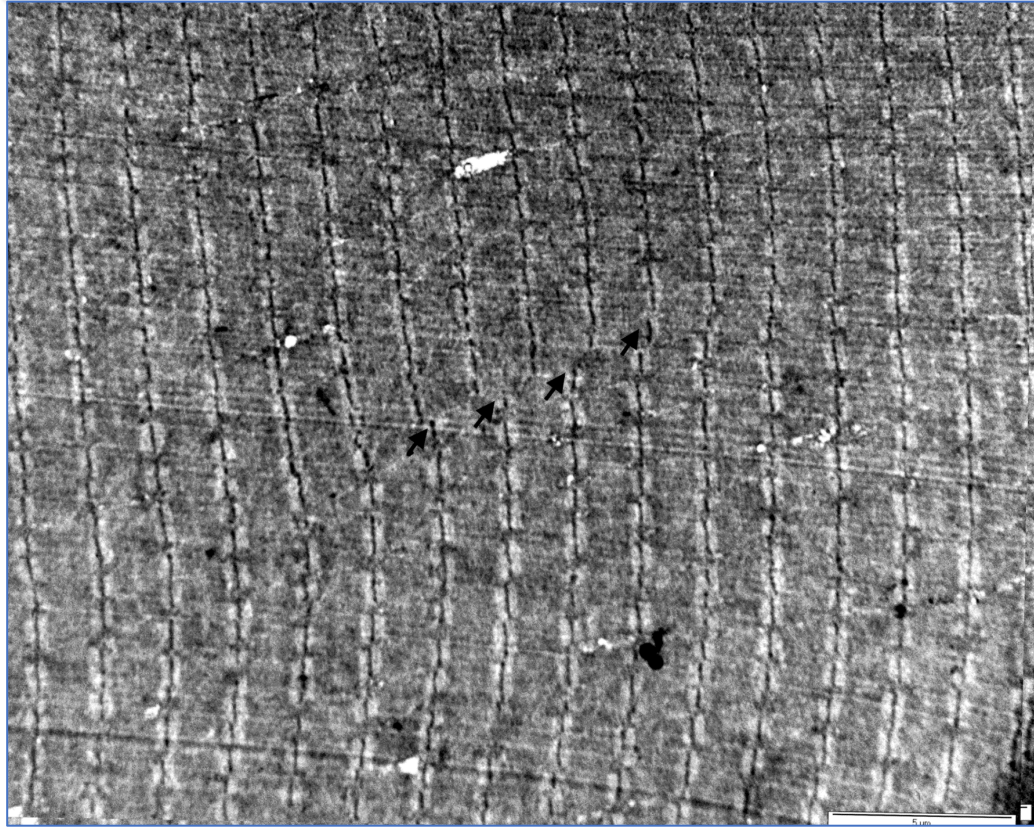
S2 uzunluğu ve Z2 çizgisi kalınlığı arasında orta düzeyde, pozitif korelasyon bulundu ($r=494$, $p=0,032$).

S1 uzunluğu ile Z1 çizgisi kalınlığı arasındaki ilişki anlamlıdır ($B=0,018$; $p=0,041$). Regresyon analizi sonucuna göre S1 uzunluğunun $1 \mu\text{m}$ artışı Z1 çizgisinin $0,018 \mu\text{m}$ kalınlaşmasına neden olmaktadır ($Z_1=0,82 + 0,18 \times I_1$).

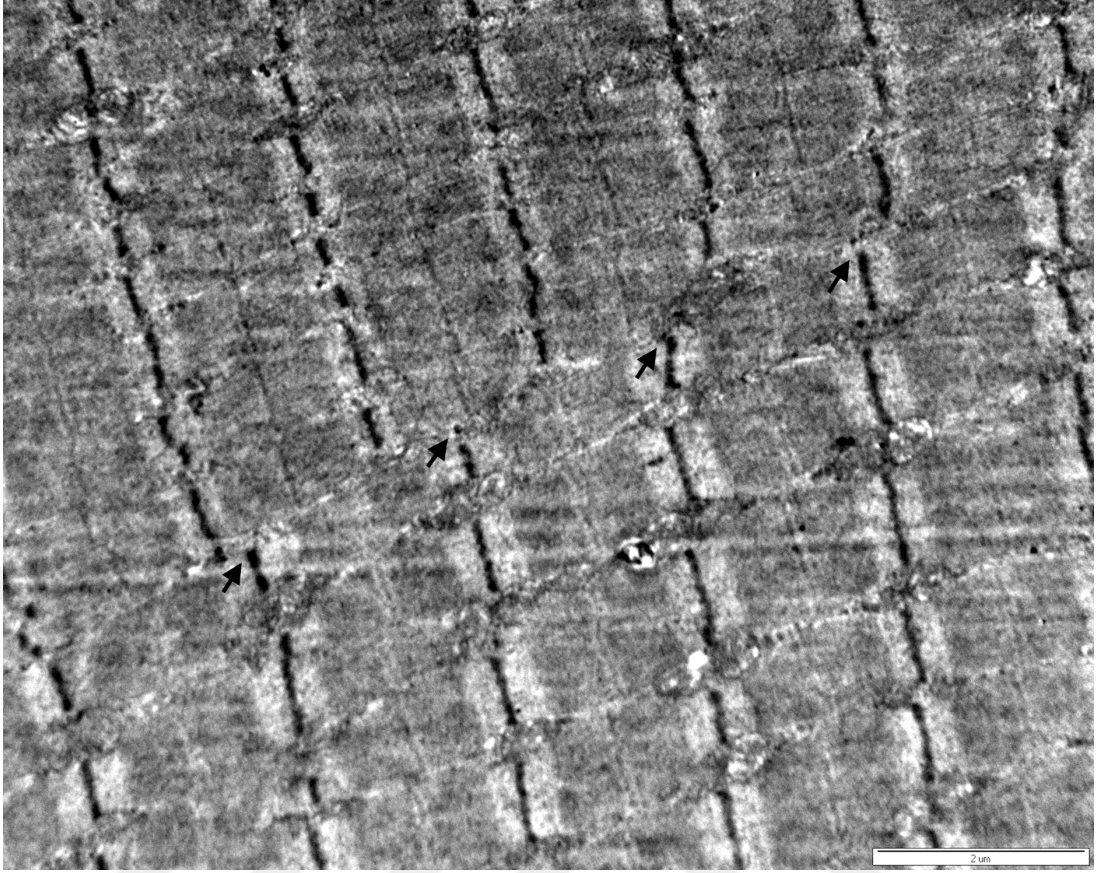
S2 uzunluğu ile Z2 çizgisi kalınlığı arasındaki ilişki olarak anlamlıdır ($B=0,026$; $p=0,006$). Regresyon analizi sonucuna göre S2 uzunluğunun 1 μm artışı Z2 çizgisinin 0,026 μm kalınlaşmasına neden olmaktadır ($Z_2=0,50 + 0,026 \times I_2$).

4.3. Sarkomerogenezis

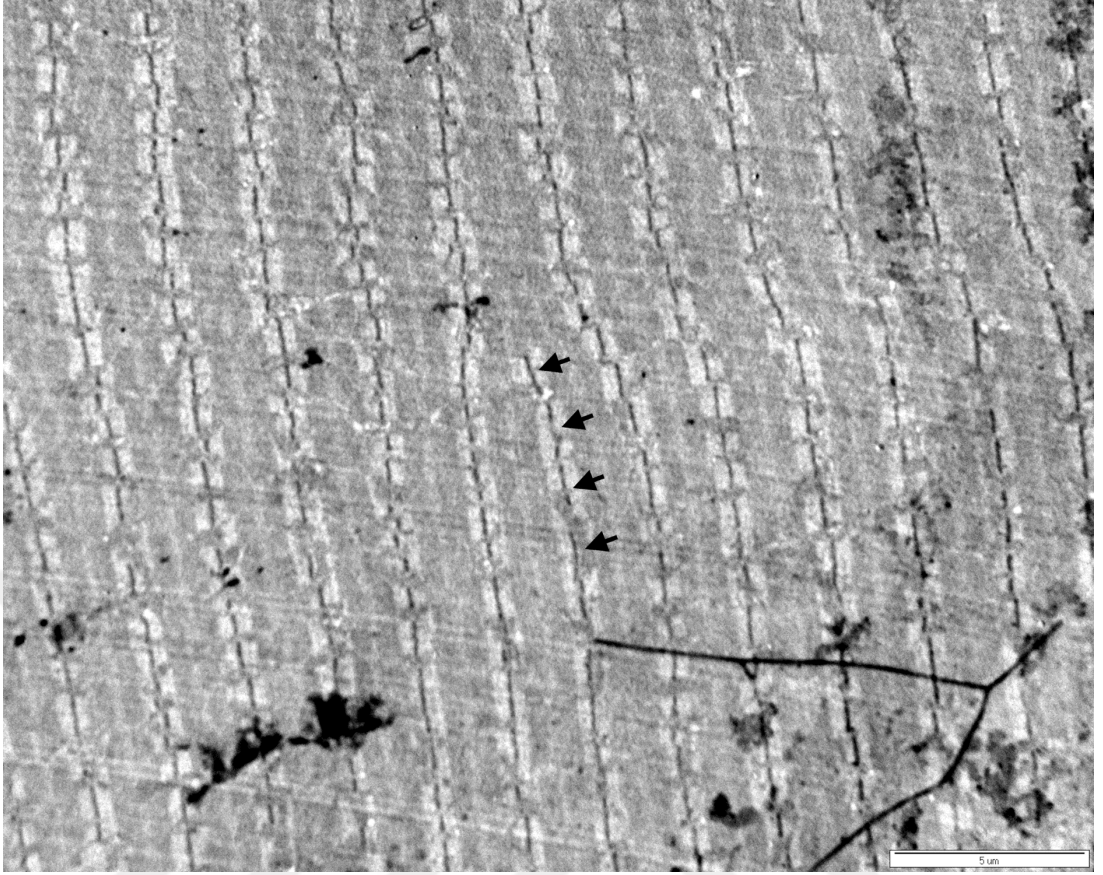
Elektron mikroskobu görüntülerinde Grup 1'de, transvers olarak devamlılığı olmayan Z çizgileri yaygın olarak gözlemlendi (Şekil 4.13., 4.15., 4.18.). Aynı sarkomerde devamlılığı olmayan Z çizgisinin sonunda iki M çizgisi görüldü (Şekil 4.17., 4.20.). Bu bölgelerde sarkomer uzunlukları ve A bandı genişliklerinin arttığı görüldü (Şekil 4.16., 4.19.).



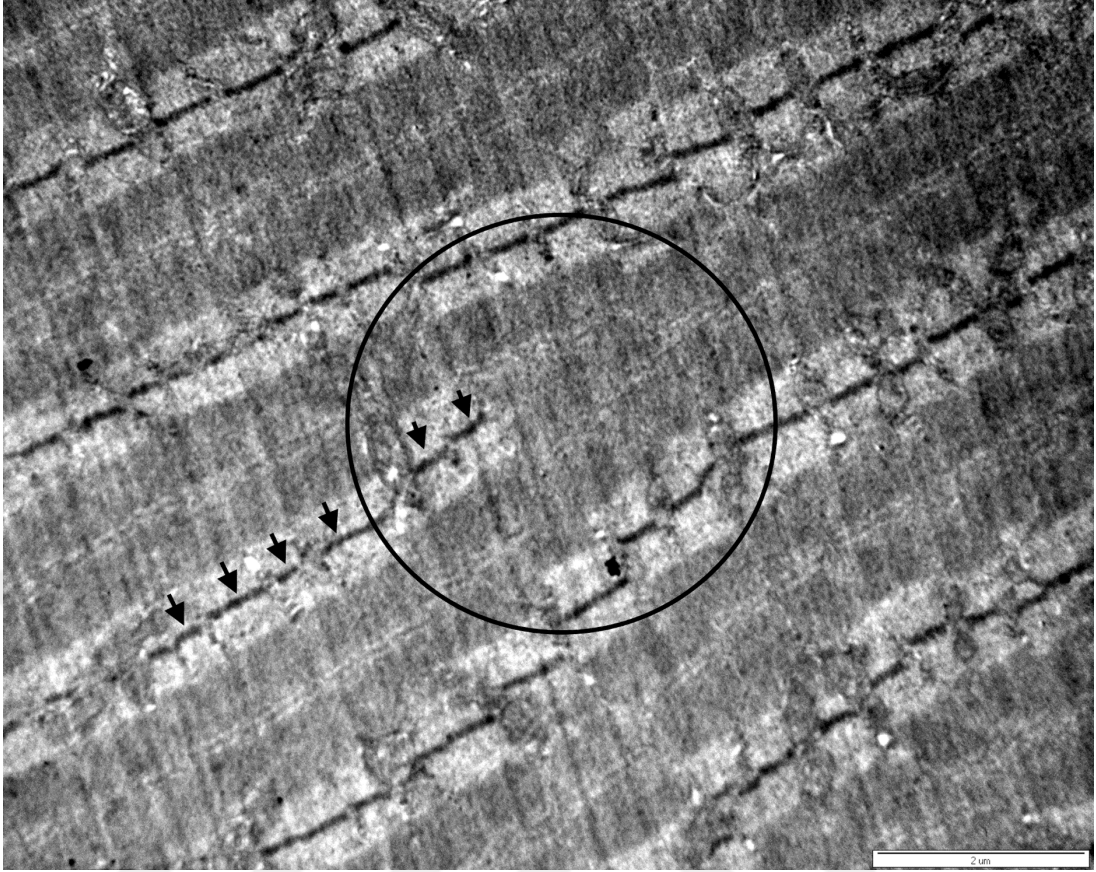
Şekil 4.13. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskobik görüntüsü (x2156). Vernierler oklarla gösterildi. Büyütülmüş hali Şekil 4.14.'de gösterildi.



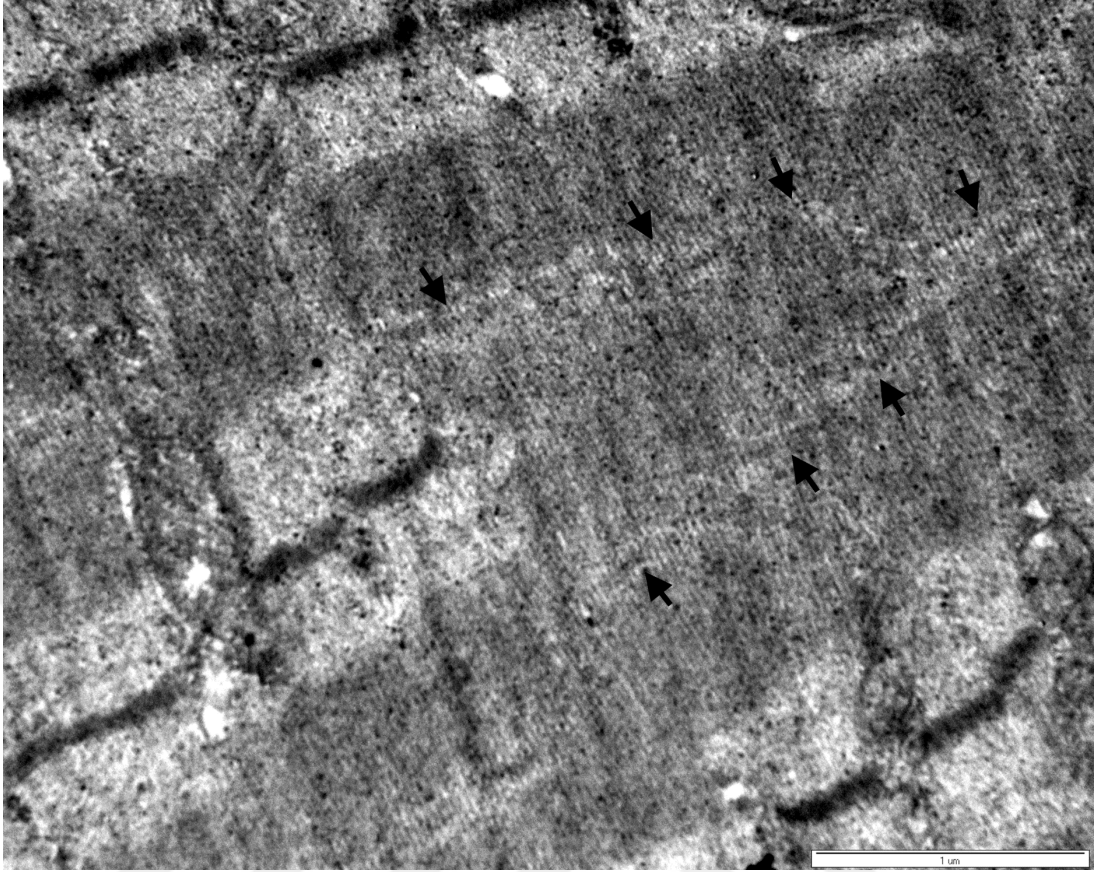
Şekil 4.14. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x6000). Vernierler oklarla gösterildi.



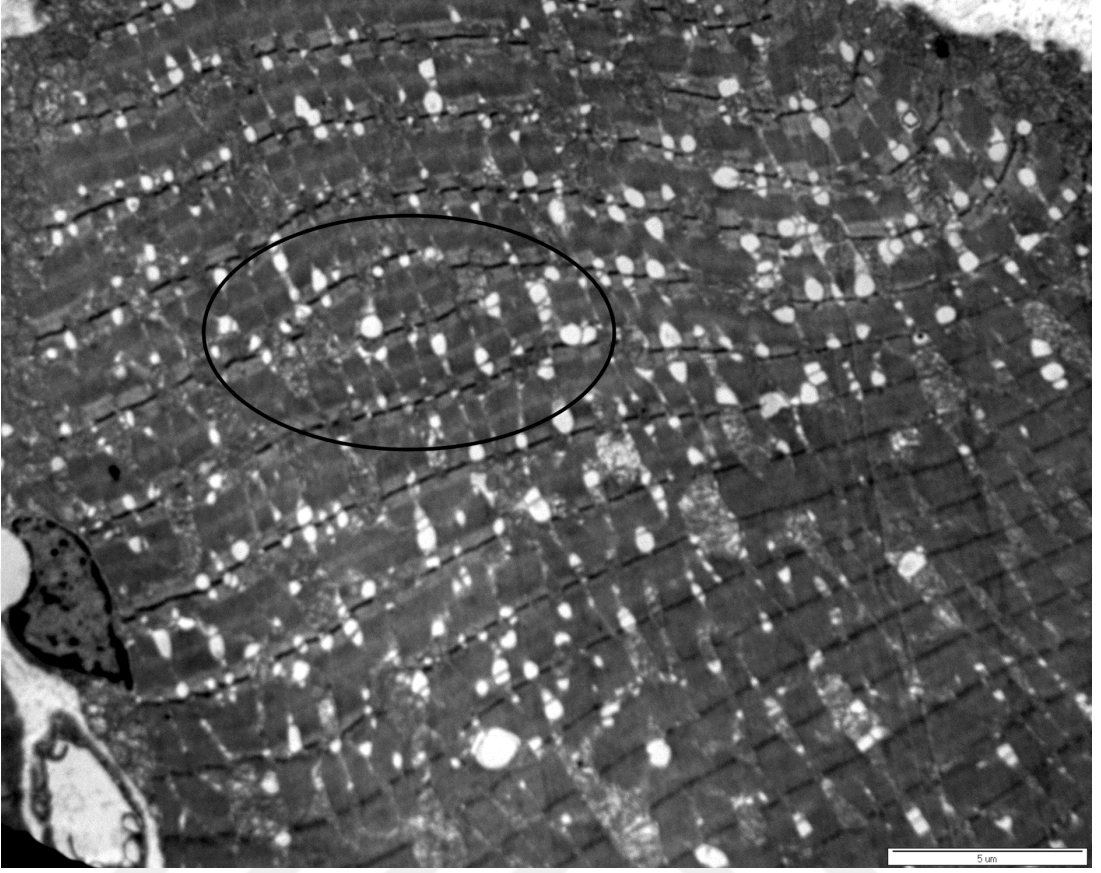
Şekil 4.15. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x2156). Oklar devamlılığı olmayan Z çizgilerini gösterir. Büyütülmüş hali Şekil 4.16.'da gösterildi.



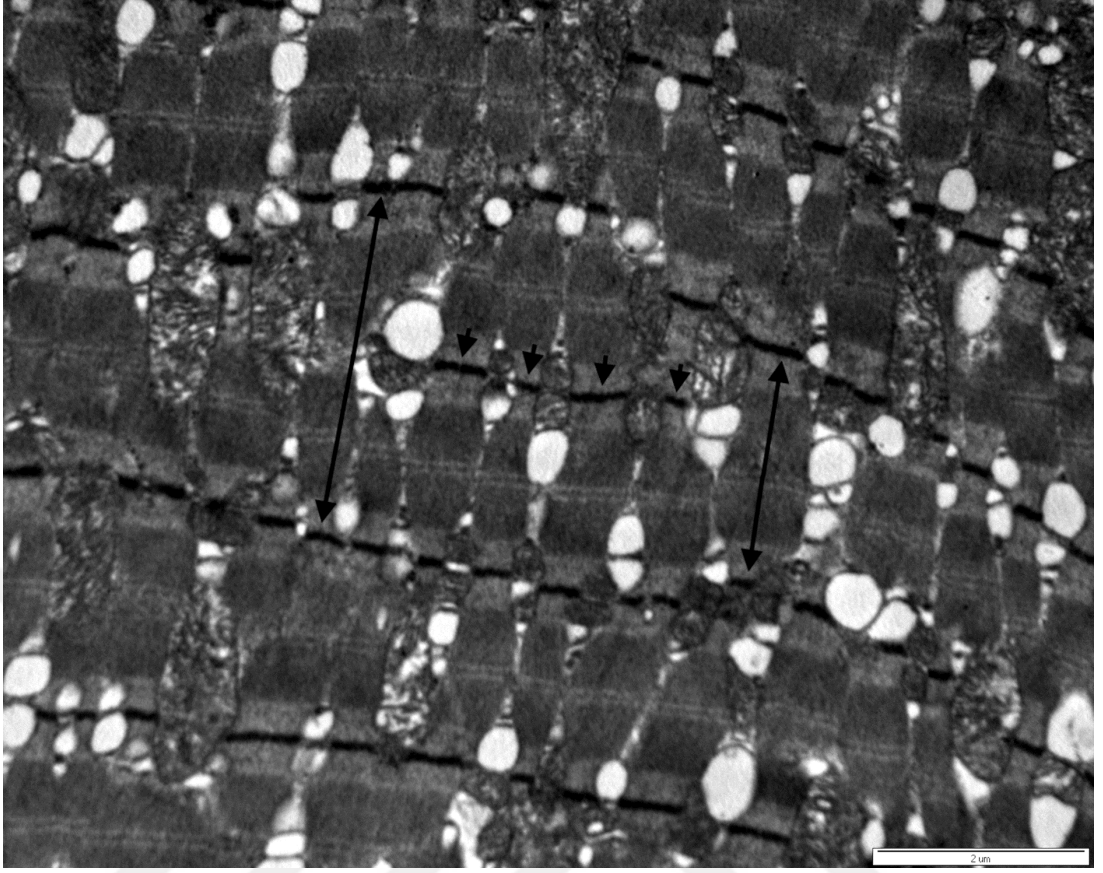
Şekil 4.16. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x6000). Oklar devamlılığı olmayan Z çizgilerini gösterir. Daire ile işaretlenmiş alanın büyütülmüş hali Şekil 4.17.'de gösterildi.



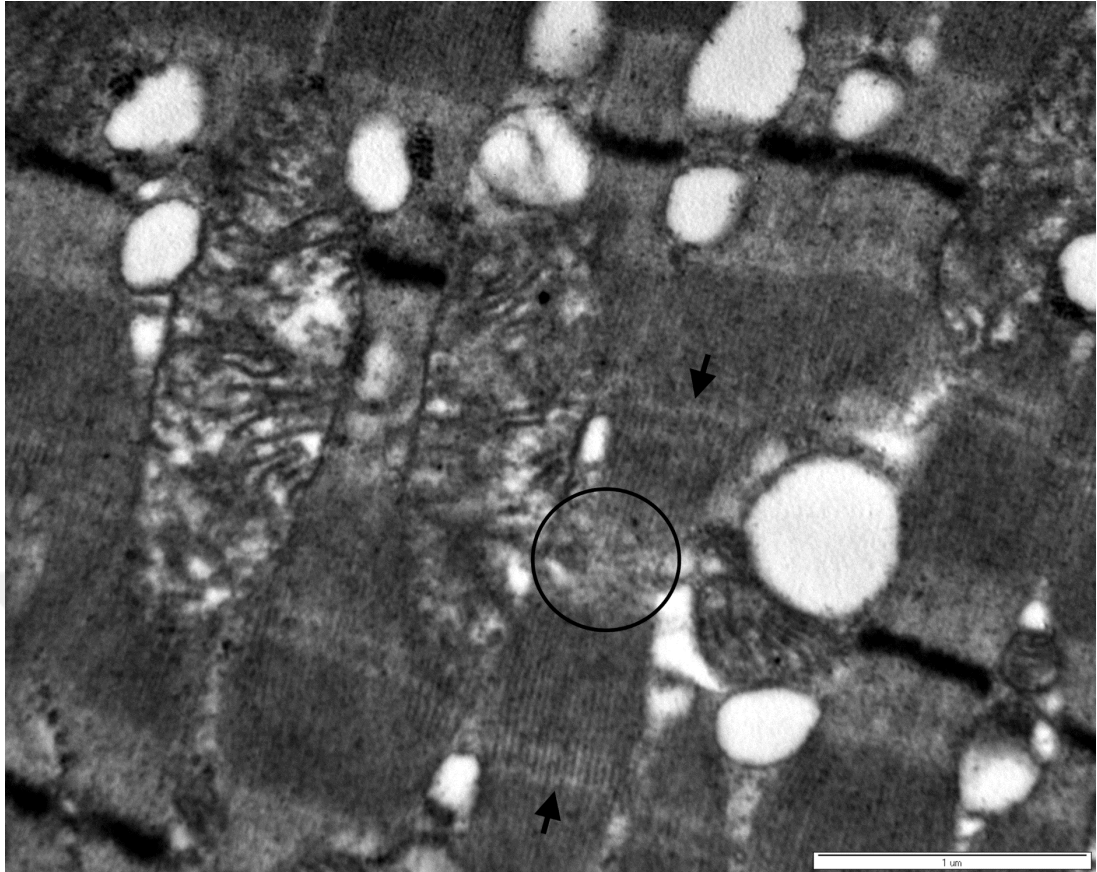
Şekil 4.17. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x16700). Oklar, Y şeklinde bir M çizgisini gösterir. Aynı sarkomer içinde iki M çizgisi vardır.



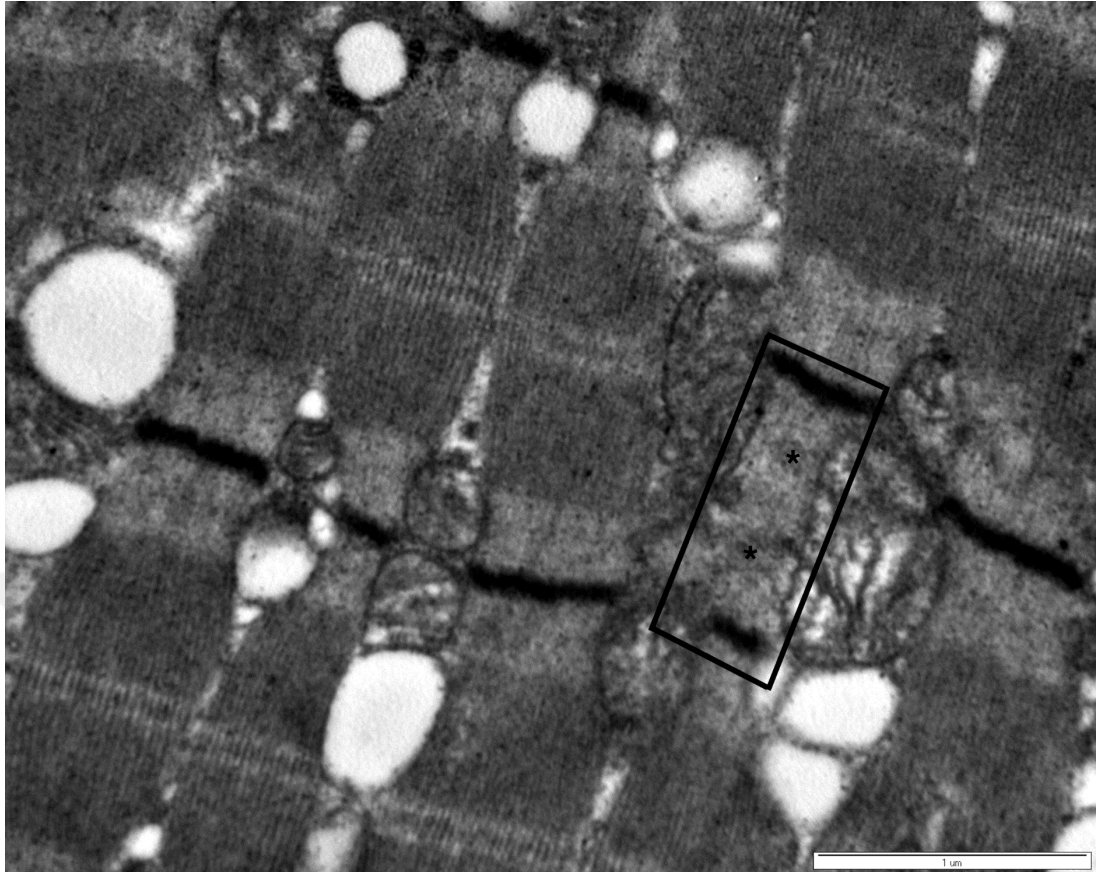
Şekil 4.18. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x2156). Daire ile işaretlenmiş alanda devamlılığı olmayan bir Z çizgisi gözlemlendi. Yeni bir transvers sarkomer serisi, iki seri sarkomer arasına transvers olarak gelişiyor olabilir. Daire ile işaretlenmiş alanın büyütülmüş hali Şekil 4.19.'da gösterildi.



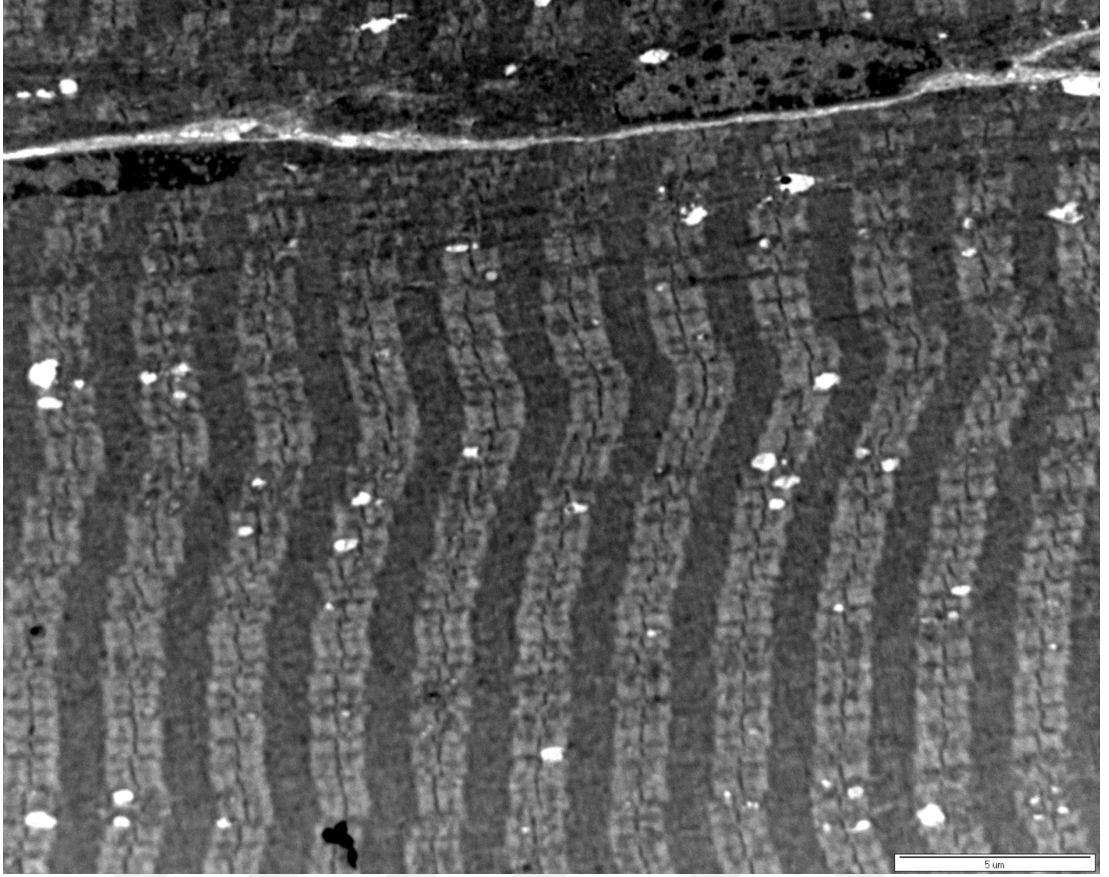
Şekil 4.19. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x6000). Oklar, devamlılığı olmayan Z çizgilerini gösterir. Çift başlı oklar, devamlılığı olmayan Z çizgisinin başlangıç ve bitiş bölgelerindeki A bantlarının ve sarkomerlerin genişlemesini gösterir. Devamlılığı olmayan Z çizgisinin sol tarafının büyütülmüş hali Şekil 4.20.'de, sağ tarafı Şekil 4.21.'de gösterildi.



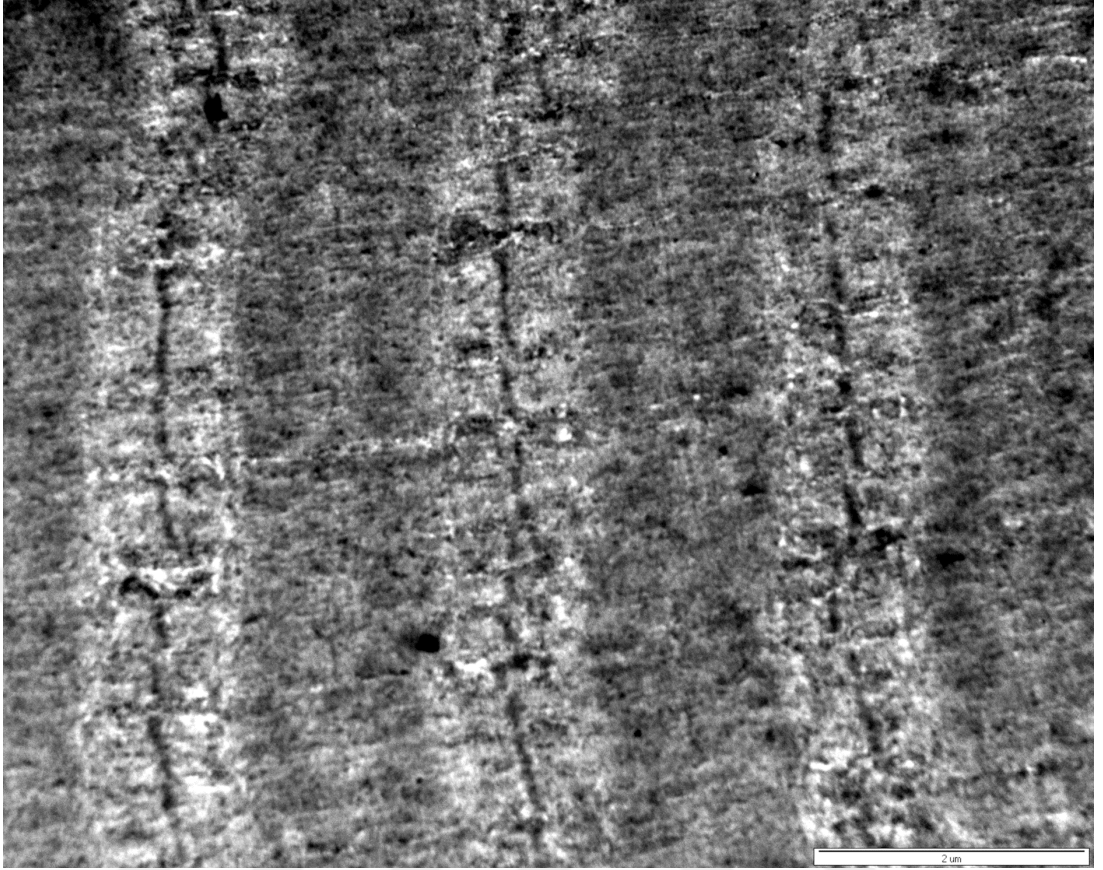
Şekil 4.20. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x16700). Şekil 4.19.'da gösterilen devamlılığı olmayan Z çizgisinin sol tarafının büyütülmüş hali gösterildi. Oklar, aynı sarkomer içinde iki M çizgisini gösterir. Daire ile işaretlenen alanda Z çizgisi olmayan I bandı görüldü.



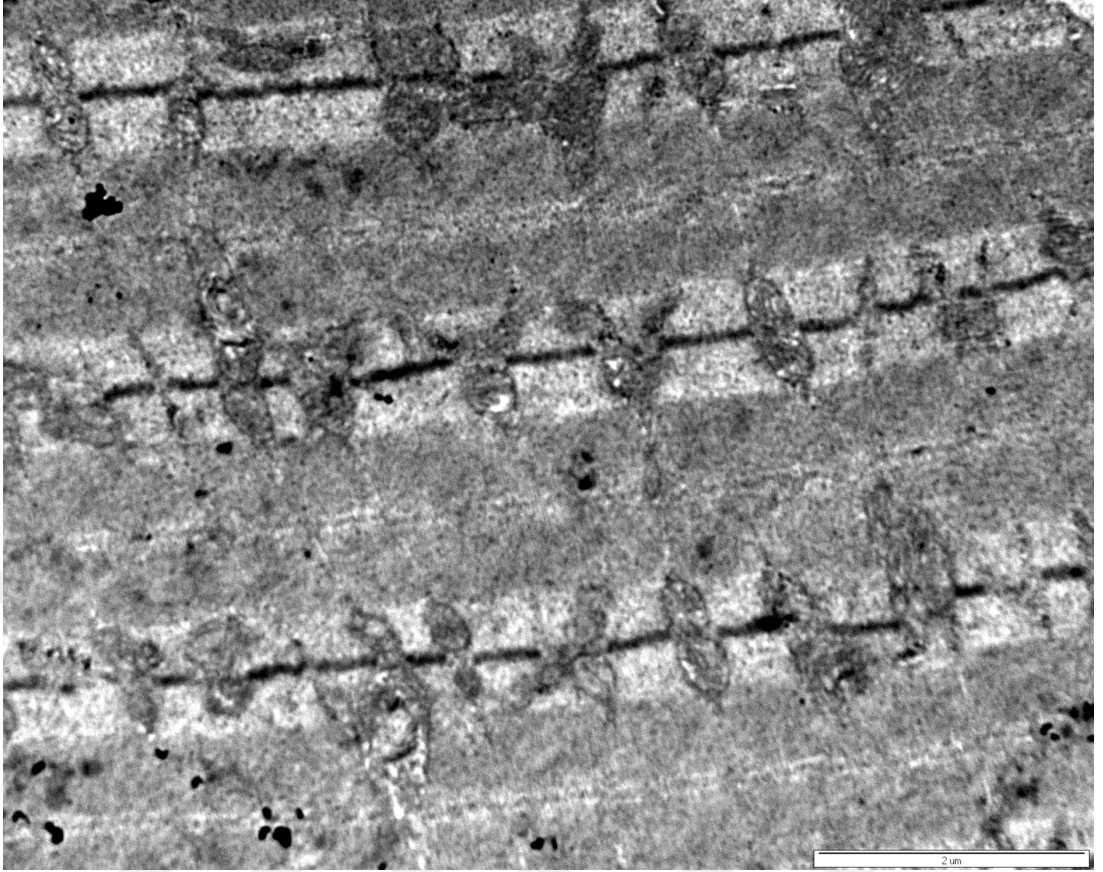
Şekil 4.21. Grup 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x16700). Şekil 4.19.'da gösterilen devamlılığı olmayan Z çizgisinin sağ tarafının büyütülmüş hali gösterildi. Dikdörtgen ile işaretlenmiş alanda yeni oluşan bir sarkomer olabilir. Çizgilenme görüldü. Tam bir A bandı oluşumu görölmedi, ancak yıldızla işaretlenmiş koyu renkli alanlar yeni oluşmuş miyozin birikintileri olabilir.



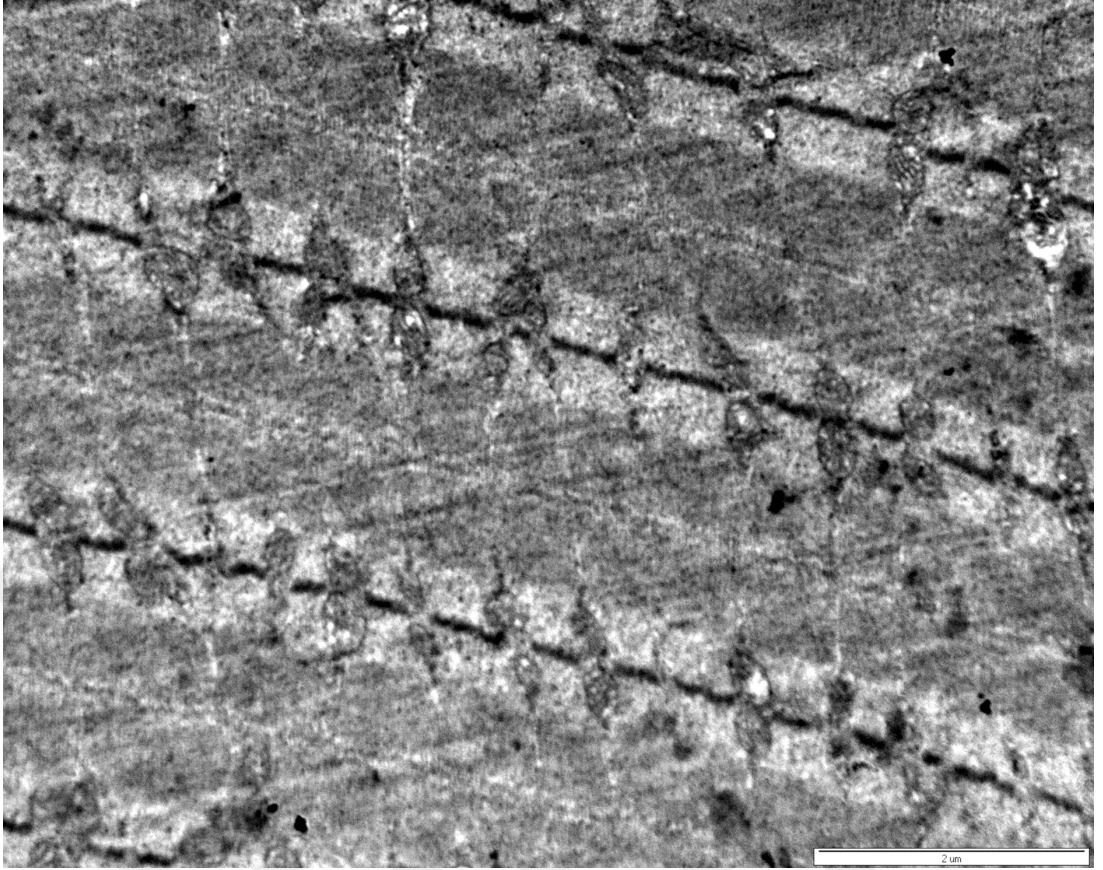
Şekil 4.22. Grup 2 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x2156). Devamlılığı olmayan Z çizgileri gözlenmedi.



Şekil 4.23. Grup 2 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x7750). Devamlılığı olmayan Z çizgileri gözlenmedi.



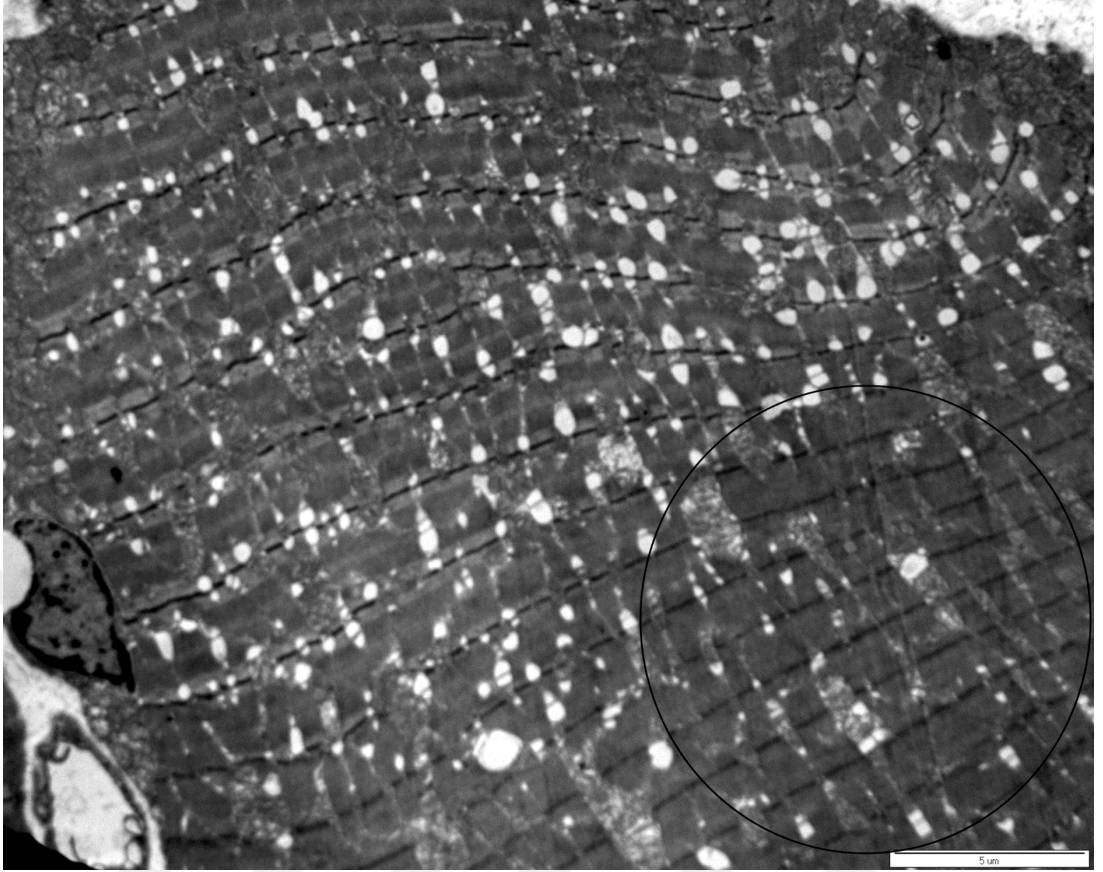
Şekil 4.24. Kontrol 1 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x7750).
Devamlılığı olmayan Z çizgileri gözlenmedi.



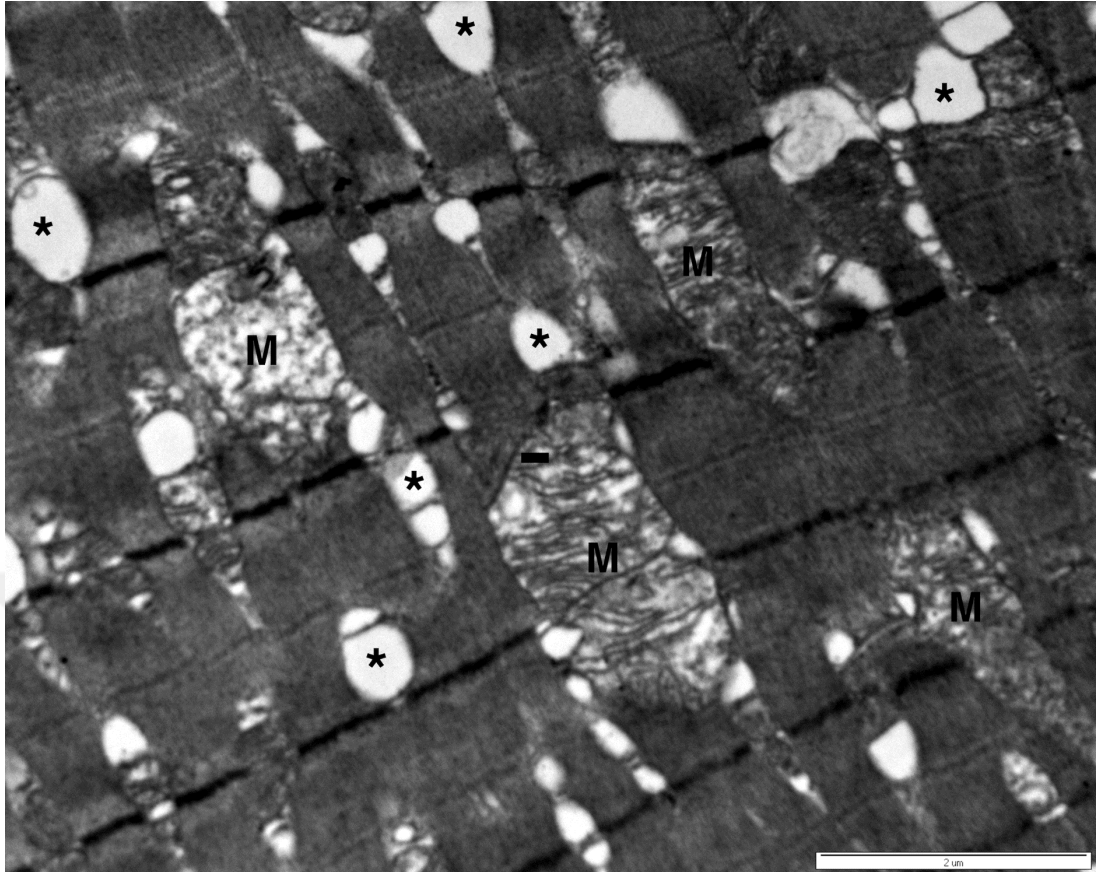
Şekil 4.25. Kontrol 2 EDL kasının elektron mikroskopik görüntüsü (x7750). Devamlılığı olmayan Z çizgileri gözlenmedi.

4.4. Kas Hasarı

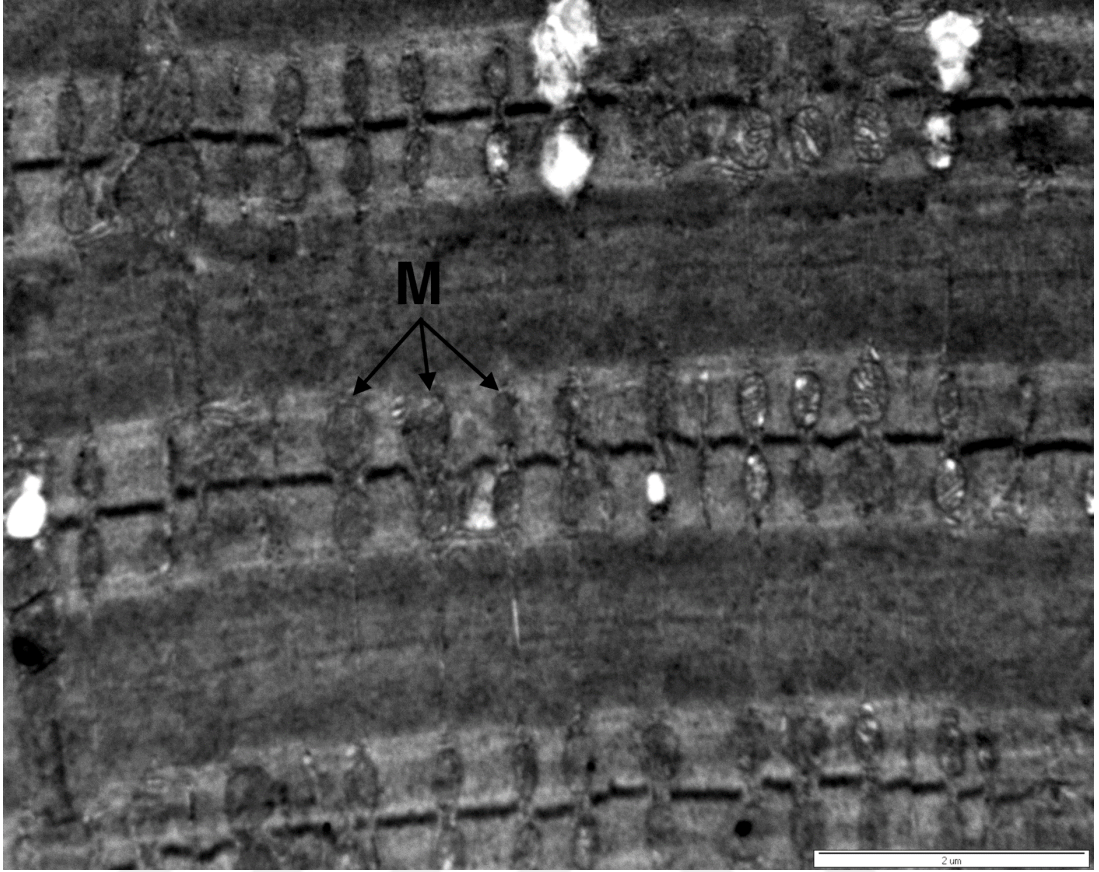
Grup 1'de yaygın vakuolarizasyon, Z çizgilerinde kalınlaşma, mitokondri boyutlarında belirgin artış, bölgesel hiperkontrakte alanlar gözlendi (Şekil 4.26., 4.27.). Bu bulgular Grup 2 (Şekil 4.28.), Kontrol 1 ve Kontrol 2 gruplarında gözlenmedi (Şekil 4.29.).



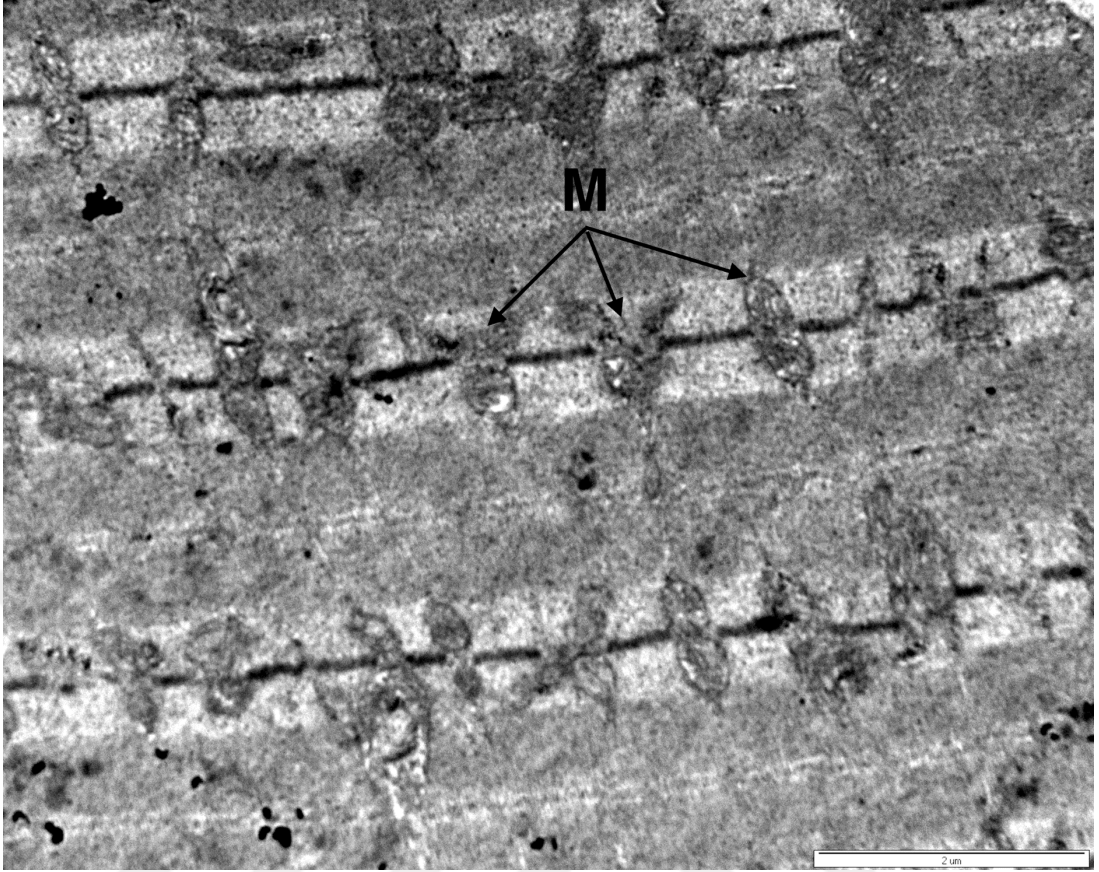
Şekil 4.26. Grup 1 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x2156). Daire ile gösterilen alanda hiperkontrakte sarkomerler görülmektedir.



Şekil 4.27. Grup 1 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x7500).
*Genişlemiş sarkoplazmik retikulum sisternaları. M: Mitokondri büyüklüklerinde önemli artış.



Şekil 4.28. Grup 2 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x7750).
M: Normal büyüklükte mitokondri görünümü.



Şekil 4.29. Kontrol 1 iskelet kası transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (x7750). M: Normal büyüklükte mitokondri görünümü.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı, iskelet kasının uzun kas uzunluğunda (G1) ve orta kas uzunluğunda (G2) uygulanan NMES'in kas mimarisi ve sarkomer yapısına olan etkisini araştırmaktır. Çalışmamızın sonucunda G1 ve G2'de lif uzunluğu ve sarkomer sayısında artış, pennasyon açısında ise azalma meydana geldiğini gördük. G1'de kas boyunun arttığını, G2'de ise kasın enine kesit alanı ve sarkomer uzunluğunun azaldığını gördük. G1'de Z band kalınlıkları, yarı sarkomer uzunlukları ve A bandı genişliğinde azalma meydana gelirken, G2'de sadece yarı sarkomer uzunlukları ve A bandı değerleri düşüktü. Ayrıca, G1'de kas hasarı göstergesi olan; yaygın vakuolarizasyon (t tübülü hasarı göstergesi), Z çizgilerinde kalınlaşma, mitokondri büyüklüklerinde belirgin artış, bölgesel hiperkontrakte alanlar (kontROLSÜZ Ca^{++} salınımının göstergesi) gördük. Bu bulgular G2, K1 ve K2'de yoktu.

G1'de kas uzunluğunu K1'e göre daha uzun bulduk. Ancak G2 ve K2'de kas uzunlukları arasında bir fark yoktu. G1'de kas sürekli pasif gerilime maruz kalmaktadır. İskelet kası, kas plastisitesi olarak adlandırılan, uygulanan mekanik kuvvetlere karşı olan adaptasyon yeteneği ile bilinmektedir. Mekanotransdüktör olan hücre iskeleti-ekstrasellüler matriks bağlantısı, hem hücre içi, miyozin kaynaklı kontraktıl kuvvetlerden türetilen kuvvetleri, hem de hücre dışı kuvvetleri iletir. Bu kuvvetler, uygulanan kuvvete göre sarkomer organizasyonunu modüle etmek için çok çeşitli sinyal yollarını ve genetik programları aktive eder (33, 40, 107, 108). Bu farklılık, pasif germeyle birlikte NMES uygulanan kasın mekanotransdüksiyon kuralları temelinde germeye olan adaptasyonunun bir sonucu olabilir (10).

Grup 1'de, statik germe, germe ile birlikte uygulanan kontraksiyon ve eksentrik eğitim sonucu görülen longitudinal kas gelişimi mekanizmalarını tetiklemiş olabilir. Statik germenin ve eksentrik eğitimin, sarkomer sayısı, lif ve kas uzunluğunu arttırdığı bilinmektedir (10, 109-111). Baroni ve ark. (112), 20 sağlıklı erkek üzerinde yaptıkları çalışmada 4 hafta eksentrik egzersizi sonucunda quadriceps kasının fasikül uzunluğunun %17-19 arttığını göstermişlerdir. Geremia ve ark. (53), 20 sağlıklı erkeğe 12 hafta eksentrik egzersiz yaptırmış ve triceps surae'nin fasikül uzunluğunun %13-21 arttığını göstermişlerdir. Statik germe ile birlikte kasa uygulanan NMES'in sonuçları,

bazı yönlerden eksentrik egzersize verilen cevaplar ile benzerlik göstermektedir. Her ikisinde de kas gerilim altında kalırken aynı zamanda bir kontraksiyon gerçekleştirmektedir. Van Dyke, pasif germe ve NMES ile elde edilen kontraksiyonunun beraber uygulanmasıyla, mekanik cevap üreten kinazın fosforilasyonunun, kasın hipertrofi ve longitudinal gelişimine neden olduğunu göstermiştir (110). Çalışmamızda Grup 1'deki kas uzunluğu artışı, longitudinal gelişime neden olan benzer mekanizmalarla gerçekleşmiş olabilir.

Her iki tedavi grubunda da longitudinal kas gelişim modelini destekleyen bulgularımız olurken kas kütlesi artışı olmamıştır. Shardonk ve ark. (16), kronik böbrek hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada 8 hafta, haftada 3 gün, 20 dk NMES (80 Hz, 400 μ s atım genişliği, 10 sn kontraksiyon süresi) uygulamış ancak kas kalınlığında artış olmadığını bulmuşlardır. Poulsen ve ark. (113), septik şok geçiren yoğun bakım hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada 7 gün boyunca 60 dakika quadriceps kasına elektrik stimülasyonu uygulamış (35 Hz, 300 μ sn atım genişliği, 4 sn interval aralığı) ve kas volümünde değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Bu, NMES'in kas kalınlığı ve kütlesini artırmadığını gösteren araştırma sonuçlarını desteklemektedir (16, 114). Birçok çalışmada kastaki anabolik faaliyetlerde artış (115-117) ve lif/fasikül uzunluğu artışı (14, 118, 119) gösterilmektedir. NMES uygulaması ile ortaya çıkan anabolik faaliyetlerdeki artış, sarkomer sayısındaki artış destekliyor olabilir. Sarkomer sayısındaki artış da lif uzunluğundaki artış destekliyor olabilir. Sonuç olarak, NMES kastaki enine bir genişlemeden (hipertrofi) daha fazla olarak longitudinal bir gelişim sağlıyor olabilir.

Çalışmamızda her iki tedavi grubunda da pennasyon açısı azalırken, G2'de enine kesit alanı azalmıştır. Bu, muhtemelen kas kütlesi artışı olmadan lif uzunluğunun artmasından kaynaklanmaktadır. Pennasyon açısındaki azalma miktarı $\cos Q$ değerini %0,5 artırırken, lif uzunluğu grup1'de %21, grup 2'de ise %17 artmıştır. Bu nedenle enine kesit alanının azalması doğal bir sonuç olarak görünmektedir.

Ancak bu sonuçları, tüm NMES uygulamalarına genellemek doğru olmayabilir. İki farklı kas uzunluğu ve seçtiğimiz NMES parametreleriyle bu sonucun, EDL gibi hızlı

kasılan kaslarda uygulanabilir olduğunu düşünüyoruz. Ancak aynı parametre seçimi ve araştırma tasarımının, solues gibi yavaş kasılan kaslarda etkisi farklı olabilir.

Lif uzunluğu artışı, hız ve eksürsionla ile ilişkilendirilmektedir. Artan lif uzunluğunun etkisi, uzunluk-gerilim eğrisinin mutlak aralığını ve kuvvet-hız eğrisinin mutlak hızını arttırmaktadır, ancak aynı tepe kuvveti ve içsel şekli muhafaza eder (120). Bu durumda iskelet kasına uygulanan NMES, uzunluk-gerilim ilişkisinin mutlak kas aktif aralığını ve kasın mutlak maksimum kontraksiyon hızını (V_{max}) artırıyor olabilir. Ancak çalışmamızda kuvvet-uzunluk ve kuvvet-hız ilişkilerini değerlendirmedik. Bu konu, uzun kas uzunluklarında uygulanan NMES ile ilgili gelecekteki çalışmalarda incelenmelidir.

5.1. Kas Hasarı

Çalışmamızda, G1'de 8 haftalık bir uygulamadan sonra Z çizgisi, sarkoplazmik reticulum, t tübülü hasarı gördük. G2'de bu bulgulara rastlamadık. Bu, uzun kas uzunluklarında elektrik stimülasyonu ile oluşturulan kas kontraksiyonunun, daha büyük bir kas hasarı oluşturduğunu gösteren çalışmaları desteklemektedir (18, 19).

Mackey et al. (121), tek seanslık bir NMES uygulamasını takiben erken yanıtlar olarak inflamasyon ve kas hasarı bulguları göstermiş, geç yanıtlar olarak da ekstrasellüler matriks proteinleri (ECM), uydu hücre sayısı ve miyofibril rejenerasyonun arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında NMES uygulamasının bir dejenerasyon-rejenerasyon sürecine yol açtığı görülmektedir. İkinci bir seanstan sonra hem inflamasyon ve kas hasarı bulgularında hem de anabolik faaliyetlerde daha az bir artış görülmüştür. Bu durum, kas hasarının daha sonraki olası bir hasara karşı koruyucu bazı mekanizmalar geliştirdiğine yorumlanmıştır (122). Bu durumda kasın orta uzunluğunda (G2) uzun süreli bir uygulamadan sonra iskelet kasının kas hasarına karşı koruyucu bir adaptasyon göstermiş olabilir.

Literatürde NMES ile ilişkili kas hasarı ve adaptasyonu çalışmaları bir veya iki seanslık uygulamaların takibinden ibarettir (18, 121, 123-125). Ancak klinikte NMES, gerekli adaptasyona ulaşmak için uzun süre uygulanan bir rehabilitasyon

uygulamasıdır. Bu çalışma NMES'in farklı uzunluklarda uzun süreli uygulanmasının kas hasarı üzerine etkisini ortaya koyan ilk çalışmadır ve sonuçları önemlidir.

5.2. Sarkomerogenezis

Williams, 4 gün boyunca sürekli olarak uzun kas uzunluğunda uygulanan alçak frekanslı (5 Hz) NMES'in, kısa kas uzunluğunda uygulanan NMES'e göre seri sarkomer sayısını arttırdığını göstermiş (126). Kasın, uzun kas uzunluğunda artmış aktivitesi longitudinal kas gelişimi ile sonuçlanmaktadır (127). Germe ile birlikte kontraksiyon uygulandığında, sarkomerik organizasyonda sadece germeye göre daha iyi sonuçlar elde edilmektedir. Tenotomize edilmiş soleus kasında germe ile birlikte uygulanan aktif kontraksiyon, seri sarkomer sayısında artış ile sonuçlanmıştır (128). Seri sarkomerogenezis, tüm sarkomerlerin kuvvet üretimi için en uygun uzunlukta olmasını garanti etmek için gereklidir. Bu nedenle, kas gerildiğinde, tüm sarkomerler kuvvet-uzunluk eğrisinin inen kolunda olacak ve bu nedenle önemli bir kuvvet üretemeyecektir. Bu nedenle, seri sarkomerlerdeki artış, tüm sarkomerlerin belirli bir kas hareketinde kuvvet üretmek için en iyi veya optimal uzunluklarında olmalarına izin verir. İnsan myokardında da statik germe ve NMES'in kombine uygulamasının yeni Z çizgileri ve 'gap junctions' gelişimini ve sarkomer uzunluğunu arttırdığı gösterilmiştir (129). Çalışma bulgularımız, gerilim altında uygulanan NMES'in sarkomer sayısına olan etkilerini desteklemektedir.

Caiozzo et al. (33), kronik statik germe altında iskelet kasında sıçanlarda 2,7 μm 'nin altında sarkomer sayısı artışının olmadığını, 2,7 μm 'nin bir eşik değeri olduğunu, bu değer üzerinde çıktıkça sarkomerogenezisin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu nedenle sarkomerogenezis için uzunluk-sensor hipotezini öne sürmüşlerdir (33). Çalışmamızda her iki grupta sarkomer uzunluğu 2,7 μm ve üzerindedir. Bu durumda NMES uyguladığımız iki eklem açısında sarkomer uzunluğunun bu eşik değerinin üzerinde olması, iki tedavi grubunda da sarkomerogenezisin görülmesini açıklayabilir.

Sağlıklı bir kas lifinin içerisinde transvers, düz ve birbirine paralel düzenli dizilmiş Z çizgileri ve sarkomer serileri görülür (Bkz. Şekil 4.28., 4.29.). Ancak

çalışmamızda G1'de yaygın olarak devamlılığı olmayan sarkomer serileri gördük. Friedrich ve ark. (130), Distrofik mdx iskelet kası mikromimarisini inceledikleri çalışmalarında ikinci harmonik görüntüleme mikroskobu görüntülerinde Y şeklinde sarkomer düzensizlikleri saptamışlardır. Bu yapıların hepsinin 'vernierler' olabileceklerini ileri sürmüşlerdir. Vernierler, bitişik miyofibriller arasındaki çizgi deseni frekansındaki yerel farklılıklar olarak tanımlanır (131). Sağlıklı iskelet kaslarında da kas periferinde görülebilen bu yapılara bu çalışmada da rastladık (Bkz. Şekil 4.13., 4.14.). Bunun, kas rejenerasyonunun bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Ancak vernier görünümünde Z çizgileri kesintiye uğramıştı ve birden fazla sarkomer serisinde var olan bu kesinti bir merdivenlenme görünümü oluşturmaktaydı. Z çizgisinin sonunda yer alan sarkomer içerisinde tek bir M çizgisi gördük (Bkz. Şekil 4.14.). Şekil 4.15.'de de Y şeklinde sarkomer serileri görülmekteydi. Fakat farklı olarak tek bir devamlılığı olmayan Z çizgisi vardı. Bu devamlılığı olmayan Z çizgisinin sonunda yer alan 3 sarkomerin her birinde 2'şer adet M çizgisi vardı (Bkz. Şekil 4.16., 4.17.). M çizgisi ise Y şeklinde görülmekteydi. Şekil 4.18.'de miyofibrilin orta kısmında bir devamlılığı olmayan Z çizgisi vardı. Z çizgilerinin dalgalı görünümde olması T tübüllerinin yırtılması sonucu olarak miyofibril içerisindeki hiperkontrakte alanların varlığından kaynaklanması kuvvetle muhtemeldir. Bu hiperkontrakte alanlar muhtemelen sarkoplazmik retikulumun olası yırtılmasından kaynaklanıyor olabilir. Böylece sarkoplazmadaki kalsiyum miktarı artar ve bazı sarkomerlerin kasılmasına ve/veya mikro hasar nedeniyle sarkomerlerin organize olamadığı yerlerde bile miyosin ve aktin arasındaki etkileşime neden olur. Şekil 4.15. ve Şekil 4.18.'de sunduğumuz devamsız serilerin yeni oluşan sarkomer serileri olabileceği düşüncesindeyiz. G1'de gördüğümüz bu Y şeklindeki sarkomer serileri, uzun kas uzunluğunda uyguladığımız yüksek frekanslı NMES ile oluşturduğumuz kas hasarını takiben oluşan rejenerasyon sürecinin bir sonucu olabilir.

Çalışmamız, NMES uygulaması sonucunda sarkomer sayısı artışını açıkça ortaya koymuştur. Sarkomer sayısı artışının ne şekilde gerçekleştiği tam olarak bilinmemekle beraber, myosin heavy chain (MHC) mRNA birikiminin myotendinöz bileşkeye yakın bölgelerde daha fazla olması nedeniyle serilerin sonuna eklenme

şeklinde olduğu düşünülebilir (33, 132). Ancak bu çalışmada sarkomerogenezisle ilişkili olabileceğini düşündüğümüz devamlılığı olmayan sarkomer serilerini kas lifinin ara bölgelerinde tespit ettik. MHC mRNA birikiminin kasın orta bölgelerinde de görüldüğü göz önünde bulundurulursa (132), bu çalışmanın sarkomerogenezis mekanizmasına yeni bir ışık tuttuğunu düşünüyoruz. Bu durumda sarkomerogenesis düşünüldüğü gibi sadece longitudinal sarkomer serisinin sonuna eklenme şeklinde değil, kas lifinin her seviyesinde transvers iki sarkomer serisinin arasına yine transvers olarak ilerleyen bir eklenme şeklinde de oluşabileceğini ileri sürüyoruz. Bu veriler, devamlılığı olmayan sarkomer serilerinin çok daha detaylı incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

5.3. Sarkomer Morfolojisi

G1'deki Z çizgisi kalınlığının K1'den daha az olduğu, ancak G2 ve K2 arasında fark olmadığını bulduk. Uzun kas uzunluğunda elektrik stimülasyonu, Z çizgilerinin daralmasıyla sonuçlandı. Z çizgisi yapısı kasın enine kesitlerinde elektron mikroskobu ile incelendi. Çizgili, tetanize ve gevşemiş kaslarda Z çizgisi yapısının gerilim ve sarkomer uzunluğu ile ilişkili olup dinamik bir yapısı olduğu gösterilmiştir (133). NMES'in her iki tedavi grubunda da kas hasarı oluşturduğunu varsayarsak, G1'deki Z çizgisinin daha ince olması, G1'deki Z çizgisini oluşturan proteinlerin G2'ye kıyasla daha fazla gerilmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Her iki NMES müdahale grubunda da yarı sarkomer uzunlukları kontrol gruplarına kıyasla daha kısaydı. Bu sonuç yeni sarkomerlerin eklenmesinin bir sonucu olabilir. Her iki NMES müdahale grubunda da sarkomer sayısının artmış olması, bu fikri desteklemektedir. Bu, daha kısa yarı sarkomer uzunluğu ve daha fazla sayıda seri sarkomer eklenmesiyle, aynı kas uzunluğunda olan kas liflerinin ve onun miyofibrillerinin hasar görmesini önlemek için geliştirilen koruyucu bir adaptasyon mekanizması olabilir.

G1 ve K1'de uzun ve kısa yarı sarkomer uzunluklarının farklı olduğu bulundu. Bu sonucun NMES'in etkisinden değil, G1 ve K1 gruplarında uzun kas uzunluğundaki pozisyonlamadan kaynaklandığını düşünüyoruz.

A bandı genişliği türler arasında farklılık gösterirken tür içinde standart uzunlukta (sıçanlarda 1,60 μm) kabul edilir (30, 31). Ancak çalışmamızda A bandı uzunluğunun da değişken olduğu görüldü ancak, sarkomer uzunluğu ile ilişkili değildi ($r=0,233$; $p=0,233$). Bu durumda A bandının daha rijid ve kararlı bir yapısı olduğunu söyleyebiliriz. Her iki tedavi grubunun da kontrol gruplarına göre daha dar A bantlarına sahip olduğunu gördük. Bu genişlik farklılığı sarkomerogenezis mekanizmasıyla ilişkili olabilir. Yeni oluşan sarkomerler daha dar A bantlarına sahip olabilir. Bu çalışma farklı uzunluklarda sabitlenen kaslarda sarkomerik hesaplamalar yapılırken Z çizgisi ve A bandı genişliğinin değişkenliğinin de göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya koymuştur.

NMES ile yapılan tedavilerde hastalar yatma veya oturma pozisyonundadır. Bu pozisyonlarda kaslar farklı kas uzunluklarındadır. Az kullanım, hem kas mimarisinde (fasikül uzunluğunda, fasikül pennasyon açısında ve kas kalınlığında azalma ile atrofi) hem de sarkomer sayısında değişikliklerle hızlı bir kas kütlesi ve fonksiyon kaybına neden olduğundan, klinik uygulamada NMES'in, kaslar uzun pozisyonda uygulanarak kısmen kaybedilenlerin geri kazanılmasını sağlanmalıdır. Bu yaklaşım, hastalarda işlevsellikte hızlı bir iyileşme sağlayabilir. Bu çalışma, uzun kas uzunluğunda uygulanan NMES'in faydalı etkilerini göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, iskelet kasına her iki uzunlukta uygulanan NMES'in lif uzunluğunu ve sarkomer sayısını artırdığını ve pennasyon açısını azalttığını göstermiştir. Uzun kas uzunluğunda uygulanan nöromüsküler elektrik stimülasyonu, iskelet kasının longitudinal gelişimini daha fazla arttırabilir. Bu nedenle, uzun kas uzunluğunda NMES uygulamak iskelet kasının boyunu uzatmak için umut verici bir strateji olabilir. Tendon transfer cerrahisi rehabilitasyonunda kas transformasyonu amacıyla kullanılabilir. Ancak yavaş kasılan kaslarda farklı sonuçlar görülebilir. Yavaş kasılan kaslarda alçak frekanslı NMES tercih edilebilir. Yavaş kasılan kaslarda da farklı uzunluklarda NMES uygulamanın etkileri araştırılmalıdır.

Romatizmal hastalıklar ve neden olduğu kalp kapak hastalığı (134), inflamasyon süreçlerinin rol aldığı kalp damar hastalığı (135), kanser (136) gibi

sistemik enflamasyonu olan yoğun bakım hastalarında ve geriatric hastalarda orta kas uzunluğunda NMES uygulanması daha güvenli bir seçenek olabilir.

Antagonist kaslar hareketin kontrolünde harekete direnç gösterirken sıklıkla kas yaralanma riski ile karşı karşıya kalırlar (60, 137). Sporcularda eksentrik kontraksiyon sırasında kas yaralanma riski yüksektir (138, 139). Spor rehabilitasyonunda kas uzunluğunu artırmak ve yaralanma riskinin önlenmesi amacıyla (140, 141), erişkin ortopedik hastalarda kas uzunluğunun artırılması gereken durumlarda (9, 142, 143), pediatrik hastalarda kas kontraktürlerinde (144) uzun kas uzunluğunda NMES uygulamak kas uzunluğunun artırılmasında daha etkili bir yöntem olabilir.

Uzun kas uzunluğunda NMES uygulaması, germeye (145) ve eksentrik egzersize alternatif olarak kasın boyunu uzatma amacıyla kullanılabilir. Ancak kas hasarı etkisi de göz önünde bulundurulmalıdır. Uzun süreli kas hasarına maruz kalan kas kronik bir inflamasyonun tetikleyebileceği bir fibrozise de neden olabilir.

Limitasyonlar

Çalışmamızın çeşitli limitasyonları bulunmaktadır. K2'deki hayvanlar kas uzunluğunu etkilemiş olabilecek yüksek vücut kütlesi ve kas kütlesi değerleri gösterdi. Buna ek olarak, %95 güven aralığı bazı değişkenler için yüksek bir aralık göstermektedir, bu da dört gruptaki hayvanlar arasındaki olası anatomik farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir, bu da bazı sonuçlarda gözlemlenmeyen olası farklılıkları etkilemiş olabilir. Ayrıca, kas hasarının değerlendirilmesinde ek olarak çalışmanın sonuçlarını destekleyecek biyokimyasal parametreler de incelenebilirdi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Uzun kas uzunluğunda NMES uygulamanın; sıçan kütlesi (Bkz. Şekil 4.1.), kas kütlesi (Bkz. Şekil 4.2.), L_f/L_m oranı (Bkz. Şekil 4.7.), sarkomer uzunluğu (Bkz. Şekil 4.8.) üzerine etkisi olmadığı gösterildi.
- Orta kas uzunluğunda NMES uygulamanın; sıçan kütlesi (Bkz. Şekil 4.1.), kas kütlesi (Bkz. Şekil 4.2.), L_f/L_m oranı (Bkz. Şekil 4.7.) üzerine etkisi olmadığı gösterildi.
- Uzun kas uzunluğunda NMES uygulamanın kas uzunluğunu arttırdığı bulundu (Bkz. Şekil 4.3.).
- Hem uzun hem de orta kas uzunluğunda NMES uygulamak kas lifi uzunluğunu artırdığı bulundu (Bkz. Şekil 4.4.).
- Hem uzun hem de orta kas uzunluğunda NMES uygulamanın pennasyon açısını daralttığı bulundu (Bkz. Şekil 4.5.).
- Hem uzun hem de orta kas uzunluğunda NMES uygulamanın sarkomer sayısını artırdığı gösterildi (Bkz. Şekil 4.9.).
- Orta kas uzunluğunda NMES uygulamak fizyolojik enine kesit alanını daralttı (Bkz. Şekil 4.6.).
- Orta kas uzunluğunda NMES uygulamak sarkomer uzunluğunu azalttı (Bkz. Şekil 4.8.).
- Yarı sarkomer uzunluğu arttıkça Z çizgisi kalınlığının da arttığı bulundu.
- Uzun yarı sarkomer uzunluğunun 1 μm artışı Z1 çizgisinin 0,018 μm kalınlaşmasına neden olduğu bulundu.
- Kısa yarı sarkomer uzunluğunun 1 μm artışı Z2 çizgisinin 0,026 μm kalınlaşmasına neden olduğu görüldü.
- Uzun olan yarı sarkomerin Z çizgisi kalınlığının, kısa olana göre daha kalın olduğu görüldü (Bkz. Şekil 4.10.).
- Uzun kas uzunluğunda NMES uygulanan tedavi grubunda, kontrol grubuna göre hem uzun hem de kısa yarı sarkomerlerin Z çizgisi kalınlıklarının daha dar olduğu görüldü (Bkz. Şekil 4.11.).

- Uzun kas uzunluğunda NMES uygulanan tedavi grubunda, uzun yarı sarkomer uzunluklarının kısaldığı görüldü (Bkz. Şekil 4.11.).
- Hem uzun hem de orta kas uzunluğunda NMES uygulamanın, kısa yarı sarkomer uzunluklarını kısalttığı görüldü (Bkz. Şekil 4.11.).
- Hem uzun hem de orta kas uzunluğunda NMES uygulamanın A bandını daralttığı görüldü (Bkz. Şekil 4.12.).
- Uzun kas uzunluğunda NMES uygulamanın sonucunda kas hasarı ile ilişkilendirilen; yaygın vakuolarizasyon (sarkotubuler sistem hasarı bulgusuyla ilişkili), z çizgisi kalınlaşması, mitokondri büyüklüklerinde belirgin artış, bölgesel hiperkontrakte alanlar (kontROLSÜZ Ca^{2+} akışının göstergesi) gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.17.).

7. KAYNAKLAR

1. Burgess LC, Swain ID, Taylor P, Wainwright TW. Strengthening quadriceps muscles with neuromuscular electrical stimulation following total hip replacement: a review. *Current Physical Medicine and Rehabilitation Reports*. 2019;7(3):275-83.
2. Maffiuletti NA, Green DA, Vaz MA, Dirks ML. Neuromuscular electrical stimulation as a potential countermeasure for skeletal muscle atrophy and weakness during human spaceflight. *Frontiers in physiology*. 2019;10:1031.
3. Sepúlveda-Jofré P, Guerra-Vega P, Fu C, Marzuca-Nassr GN. Skeletal muscle atrophy in critical ill patients and the use of electrostimulation as a treatment strategy: Recommendations for Clinical Practice. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 2021.
4. Guo Y, Phillips BE, Atherton PJ, Piasecki M. Molecular and neural adaptations to neuromuscular electrical stimulation; Implications for ageing muscle. *Mechanisms of ageing and development*. 2021;193:111402.
5. Thomé GR, Costa RA, Marquezi ML, Aparecido JM, Durigan JLQ, Amorim CF, et al. Effects of neuromuscular electrical stimulation on torque and performance in recreational distance runners: A randomized controlled trial. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*. 2021;28:369-75.
6. Oleinik P, Sumin A, Bezdenezhnykh A. Effects of the use neuromuscular electrical stimulation of the lower extremities in the prehabilitation of patients in a before cardiac surgery. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2021;28(Supplement_1):zwab061. 365.
7. Maffiuletti NA, Gondin J, Place N, Stevens-Lapsley J, Vivodtzev I, Minetto MA. Clinical use of neuromuscular electrical stimulation for neuromuscular rehabilitation: what are we overlooking? *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2018;99(4):806-12.
8. Blazeovich AJ, Collins DF, Millet GY, Vaz MA, Maffiuletti NA. Enhancing adaptations to neuromuscular electrical stimulation training interventions. *Exercise and sport sciences reviews*. 2021;49(4):244.
9. Lieber RL, Fridén J. Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. *Muscle & nerve*. 2000;23(11):1647-66.
10. Gregory JE, Morgan DL, Allen TJ, Proske U. The shift in muscle's length-tension relation after exercise attributed to increased series compliance. *European journal of applied physiology*. 2007;99(4):431-41.
11. Peixinho CC, Martins NSF, de Oliveira LF, Machado JC. Structural adaptations of rat lateral gastrocnemius muscle-tendon complex to a chronic stretching program and their quantification based on ultrasound biomicroscopy and optical microscopic images. *Clinical biomechanics*. 2014;29(1):57-62.
12. Van Dyke JM, Bain JL, Riley DA. Stretch-activated signaling is modulated by stretch magnitude and contraction. *Muscle & nerve*. 2014;49(1):98-107.
13. Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *Journal of anatomy*. 1978;127(Pt 3):459.
14. Devrimsel G, Metin Y, Serdaroglu Beyazal M. Short-term effects of neuromuscular electrical stimulation and ultrasound therapies on muscle architecture and functional capacity in knee osteoarthritis: a randomized study. *Clinical rehabilitation*. 2019;33(3):418-27.

15. de Oliveira Melo M, Pompeo KD, Baroni BM, Vaz MA. Effects of neuromuscular electrical stimulation and low-level laser therapy on neuromuscular parameters and health status in elderly women with knee osteoarthritis: a randomized trial. *Journal of rehabilitation medicine*. 2016;48(3):293-9.
16. Schardong J, Dipp T, Bozzeto CB, da Silva MG, Baldissera GL, Ribeiro RdC, et al. Effects of intradialytic neuromuscular electrical stimulation on strength and muscle architecture in patients with chronic kidney failure: randomized clinical trial. *Artificial organs*. 2017;41(11):1049-58.
17. Maffiuletti NA. Physiological and methodological considerations for the use of neuromuscular electrical stimulation. *European journal of applied physiology*. 2010;110(2):223-34.
18. Fouré A, Ogier AC, Guye M, Gondin J, Bendahan D. Muscle alterations induced by electrostimulation are lower at short quadriceps femoris length. *European Journal of Applied Physiology*. 2020;120(2):325-35.
19. Fouré A, Gondin J. Skeletal Muscle Damage Produced by Electrically Evoked Muscle Contractions. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2021;49(1):59-65.
20. Langeard A, Bigot L, Chastan N, Gauthier A. Does neuromuscular electrical stimulation training of the lower limb have functional effects on the elderly?: A systematic review. *Experimental gerontology*. 2017;91:88-98.
21. Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function, and plasticity*: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
22. Lieber RL. Skeletal muscle architecture: implications for muscle function and surgical tendon transfer. *Journal of Hand Therapy*. 1993;6(2):105-13.
23. Lieber RL, Fridén J. Clinical significance of skeletal muscle architecture. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001;383:140-51.
24. Lieber RL. *Skeletal muscle structure and function. Implications for Rehabilitation and Sports Medicine*. 1992.
25. Ounjian M, Roy R, Eldred E, Garfinkel A, Payne J, Armstrong A, et al. Physiological and developmental implications of motor unit anatomy. *Journal of neurobiology*. 1991;22(5):547-59.
26. Loeb G, Pratt C, Chanaud C, Richmond F. Distribution and innervation of short, interdigitated muscle fibers in parallel-fibered muscles of the cat hindlimb. *Journal of Morphology*. 1987;191(1):1-15.
27. Purslow PP. Muscle fascia and force transmission. *Journal of bodywork and movement therapies*. 2010;14(4):411-7.
28. Rose JA, Sandefur M, Huskey S, Demler JL, Butcher MT. Muscle architecture and out-force potential of the thoracic limb in the eastern mole (*Scalopus aquaticus*). *Journal of morphology*. 2013;274(11):1277-87.
29. Rupert JE, Rose JA, Organ JM, Butcher MT. Forelimb muscle architecture and myosin isoform composition in the groundhog (*Marmota monax*). *Journal of Experimental Biology*. 2015;218(2):194-205.
30. Gordon A, Huxley AF, Julian F. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *The Journal of physiology*. 1966;184(1):170-92.
31. Burkholder TJ, Lieber RL. Sarcomere length operating range of vertebrate muscles during movement. *Journal of Experimental Biology*. 2001;204(9):1529-36.

32. Rassier DE, MacIntosh B, Herzog W. Length dependence of active force production in skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 1999;86(5):1445-57.
33. Caiozzo VJ, Utkan A, Chou R, Khalafi A, Chandra H, Baker M, et al. Effects of Distraction on Muscle Length: Mechanisms Involved in Sarcomerogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007). 2002;403:S133-S45.
34. Williams PE, Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. *Journal of cell science*. 1971;9(3):751-67.
35. Mancinelli R, Toniolo L, Di Filippo ES, Doria C, Marrone M, Maroni CR, et al. Neuromuscular Electrical Stimulation Induces Skeletal Muscle Fiber Remodeling and Specific Gene Expression Profile in Healthy Elderly. *Frontiers in Physiology*. 2019;10.
36. Elsalanty M, Makarov M, Cherkashin A, Birch J, Samchukov M. Changes in pennate muscle architecture after gradual tibial lengthening in goats. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2007;290(5):461-7.
37. Cavalcante JGT, de Cassia Marqueti R, Geremia JM, de Sousa Neto IV, Baroni BM, Silbernagel KG, et al. The effect of quadriceps muscle length on maximum neuromuscular electrical stimulation evoked contraction, muscle architecture, and Tendon-Aponeurosis Stiffness. *Frontiers in physiology*. 2021;12.
38. Brown SJ, Donnelly A. Changes in human skeletal muscle length during stimulated eccentric muscle actions. *The Journal of Physiological Sciences*. 2011;61(1):31-6.
39. Blazeovich AJ, Cannavan D, Coleman DR, Horne S. Influence of concentric and eccentric resistance training on architectural adaptation in human quadriceps muscles. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103(5):1565-75.
40. Baroni BM, Geremia JM, Rodrigues R, Franke RDA, Karamanidis K, Vaz MA. Muscle architecture adaptations to knee extensor eccentric training: rectus femoris vs. vastus lateralis. *Muscle & nerve*. 2013;48(4):498-506.
41. Cuthbert M, Ripley N, McMahon JJ, Evans M, Haff GG, Comfort P. The effect of Nordic hamstring exercise intervention volume on eccentric strength and muscle architecture adaptations: a systematic review and meta-analyses. *Sports Medicine*. 2020;50:83-99.
42. Williams P. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. *Annals of the rheumatic diseases*. 1990;49(5):316-7.
43. Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. *Annals of the rheumatic diseases*. 1988;47(12):1014-6.
44. Williams PE, Goldspink G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. *Journal of Anatomy*. 1973;116(Pt 1):45.
45. Shur N, Creedon L, Skirrow S, Atherton P, MacDonald I, Lund J, et al. Age-related changes in muscle architecture and metabolism in humans: The likely contribution of physical inactivity to age-related functional decline. *Ageing Research Reviews*. 2021;68:101344.
46. Brown M, Fisher JS, Salsich G. Stiffness and muscle function with age and reduced muscle use. *Journal of orthopaedic research*. 1999;17(3):409-14.
47. Morse CI, Thom JM, Birch KM, Narici MV. Changes in triceps surae muscle architecture with sarcopenia. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2005;183(3):291-8.

48. Dias CP, Freire B, Goulart NB, Onzi ES, Becker J, Gomes I, et al. Muscle architecture and torque production in stroke survivors: an observational study. *Topics in stroke rehabilitation*. 2017;24(3):206-13.
49. Kim JM, Tay MRJ, Rajeswaran DK, Tham S-L, Lui WL, Kong KH. Changes in muscle architecture on ultrasound in patients early after stroke. *NeuroRehabilitation*. 2021;49(4):565-72.
50. Mohagheghi AA, Khan T, Meadows TH, Giannikas K, Baltzopoulos V, Maganaris CN. Differences in gastrocnemius muscle architecture between the paretic and non-paretic legs in children with hemiplegic cerebral palsy. *Clinical biomechanics*. 2007;22(6):718-24.
51. Boakes JL, Foran J, Ward SR, Lieber RL. CASE REPORT: Muscle Adaptation by Serial Sarcomere Addition 1 Year after Femoral Lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007). 2007;456:250-3.
52. Morgan D. New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophysical journal*. 1990;57(2):209-21.
53. Geremia JM, Baroni BM, Bini RR, Lanferdini FJ, de Lima AR, Herzog W, et al. Triceps surae muscle architecture adaptations to eccentric training. *Frontiers in physiology*. 2019;10:1456.
54. Duhig SJ, Bourne MN, Buhmann RL, Williams MD, Minett GM, Roberts LA, et al. Effect of concentric and eccentric hamstring training on sprint recovery, strength and muscle architecture in inexperienced athletes. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2019;22(7):769-74.
55. Lizama-Pérez R, Chiroso-Rios L, Olave E, Ferragut C, Vila H, Jerez-Mayorga D. Effects of Eccentric Exercise on Muscle Architecture in Adults: A Systematic Review. 2022.
56. Guadagnin EC, Stoelben KJ, Carpes FP, Vaz MA. Neuromuscular and functional responses to concentric and eccentric strength training in older adults: A systematic review. *Kinesiology*. 2022;54(2):357-67.
57. Kim SY, Ko JB, Farthing JP, Butcher SJ. Investigation of supraspinatus muscle architecture following concentric and eccentric training. *Journal of science and medicine in sport*. 2015;18(4):378-82.
58. Franchi MV, Reeves ND, Narici MV. Skeletal muscle remodeling in response to eccentric vs. concentric loading: morphological, molecular, and metabolic adaptations. *Frontiers in physiology*. 2017;8:447.
59. Lieber RL, Fridén J. Morphologic and mechanical basis of delayed-onset muscle soreness. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2002;10(1):67-73.
60. Brockett CL, Morgan DL, Proske U. Human hamstring muscles adapt to eccentric exercise by changing optimum length. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2001;33(5):783-90.
61. Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *The FASEB journal*. 2006;20(7):811-27.
62. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological reviews*. 2004;84(2):649-98.
63. Burkholder TJ. Mechanotransduction in skeletal muscle. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2007;12:174.
64. Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW. Control of the size of the human muscle mass. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:799-828.

65. Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *Journal of anatomy*. 1999;194(3):323-34.
66. Burke D, Gorman E, Stokes D, Lennon O. An evaluation of neuromuscular electrical stimulation in critical care using the ICF framework: a systematic review and meta-analysis. *The clinical respiratory journal*. 2016;10(4):407-20.
67. Intiso D, Santamato A, Di Rienzo F. Effect of electrical stimulation as an adjunct to botulinum toxin type A in the treatment of adult spasticity: a systematic review. *Disability and rehabilitation*. 2017;39(21):2123-33.
68. Monaghan B, Caulfield B, O'Mathúna DP. Surface neuromuscular electrical stimulation for quadriceps strengthening pre and post total knee replacement. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010(1).
69. Volpato HBB, Szego P, Lenza M, Milan SL, Talerman C, Ferretti M. Femoral quadriceps neuromuscular electrical stimulation after total knee arthroplasty: a systematic review. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;14:77-98.
70. Seyri KM, Maffiuletti NA. Effect of electromyostimulation training on muscle strength and sports performance. *Strength & Conditioning Journal*. 2011;33(1):70-5.
71. Maggioni MA, Cè E, Rampichini S, Ferrario M, Giordano G, Veicsteinas A, et al. Electrical stimulation versus kinesiotherapy in improving functional fitness in older women: a randomized controlled trial. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2010;50(3):e19-e25.
72. Mignardot JB, Deschamps T, Le Goff CG, Roumier FX, Duclay J, Martin A, et al. Neuromuscular electrical stimulation leads to physiological gains enhancing postural balance in the pre-frail elderly. *Physiological reports*. 2015;3(7):e12471.
73. Gondin J, Duclay J, Martin A. Soleus-and gastrocnemii-evoked V-wave responses increase after neuromuscular electrical stimulation training. *Journal of neurophysiology*. 2006;95(6):3328-35.
74. Gondin J, Brocca L, Bellinzona E, d'Antona G, Maffiuletti NA, Miotti D, et al. Neuromuscular electrical stimulation training induces atypical adaptations of the human skeletal muscle phenotype: a functional and proteomic analysis. *Journal of applied physiology*. 2011;110(2):433-50.
75. Pérez M, Lucia A, Rivero J-L, Serrano A, Calbet J-A, Delgado M, et al. Effects of transcutaneous short-term electrical stimulation on M. vastus lateralis characteristics of healthy young men. *Pflügers Archiv*. 2002;443:866-74.
76. Gauthier JM, Thériault R, Thériault G, Gélinas Y, Simoneau J-A. Electrical stimulation-induced changes in skeletal muscle enzymes of men and women. *Medicine and science in sports and exercise*. 1992;24(11):1252-6.
77. Burke D, Gandevia SC, McKeon B. The afferent volleys responsible for spinal proprioceptive reflexes in man. *The Journal of physiology*. 1983;339(1):535-52.
78. Bergquist A, Clair J, Lagerquist O, Mang C, Okuma Y, Collins D. Neuromuscular electrical stimulation: implications of the electrically evoked sensory volley. *European journal of applied physiology*. 2011;111:2409-26.
79. Collins DF. Central contributions to contractions evoked by tetanic neuromuscular electrical stimulation. *Exercise and sport sciences reviews*. 2007;35(3):102-9.

80. Benavent-Caballer V, Rosado-Calatayud P, Segura-Ortí E, Amer-Cuenca J, Lisón J. Effects of three different low-intensity exercise interventions on physical performance, muscle CSA and activities of daily living: a randomized controlled trial. *Experimental gerontology*. 2014;58:159-65.
81. Kern H, Barberi L, Löfler S, Sbardella S, Burggraf S, Fruhmans H, et al. Electrical stimulation counteracts muscle decline in seniors. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:189.
82. Langeard A, Bigot L, Loggia G, Chastan N, Quarck G, Gauthier A. Plantar flexor strength training with home-based neuromuscular electrical stimulation improves limits of postural stability in older adults. *Journal of Physical Activity and Health*. 2020;17(6):657-61.
83. Vanderthommen M, Duchateau J. Electrical stimulation as a modality to improve performance of the neuromuscular system. *Exercise and sport sciences reviews*. 2007;35(4):180-5.
84. Lieber RL, Kelly MJ. Factors influencing quadriceps femoris muscle torque using transcutaneous neuromuscular electrical stimulation. *Physical therapy*. 1991;71(10):715-21.
85. Lake DA. Neuromuscular electrical stimulation. *Sports medicine*. 1992;13(5):320-36.
86. Smith GV, Alon G, Roys SR, Gullapalli RP. Functional MRI determination of a dose-response relationship to lower extremity neuromuscular electrical stimulation in healthy subjects. *Experimental brain research*. 2003;150:33-9.
87. Maddocks M, Nolan CM, Man WD, Polkey MI, Hart N, Gao W, et al. Neuromuscular electrical stimulation to improve exercise capacity in patients with severe COPD: a randomised double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2016;4(1):27-36.
88. Babault N, Cometti G, Bernardin M, Pousson M, Chatard J-C. Effects of electromyostimulation training on muscle strength and power of elite rugby players. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 2007;21(2):431-7.
89. Ward SR, Eng CM, Smallwood LH, Lieber RL. Are current measurements of lower extremity muscle architecture accurate? *Clinical orthopaedics and related research*. 2009;467(4):1074-82.
90. Eng CM, Smallwood LH, Rainiero MP, Lahey M, Ward SR, Lieber RL. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *Journal of Experimental Biology*. 2008;211(14):2336-45.
91. Ledvina M, Segal SS. Sarcomere length and capillary curvature of rat hindlimb muscles in vivo. *Journal of Applied Physiology*. 1995;78(6):2047-51.
92. Gruner J, Altman J, Spivack N. Effects of arrested cerebellar development on locomotion in the rat. *Experimental brain research*. 1980;40(4):361-73.
93. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Filipe VM, et al. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*. 2002;26(5):630-5.
94. Dreibati B, Lavet C, Pinti A, Poumarat G. Influence of electrical stimulation frequency on skeletal muscle force and fatigue. *Annals of physical and rehabilitation medicine*. 2010;53(4):266-77.
95. Shen J, Nie X, Huang S-Y, Qin Y-Q, Pan L-L, Wang X-T. Neuromuscular electrical stimulation improves muscle atrophy induced by chronic hypoxia-

- hypercapnia through the MicroRNA-486/PTEN/FoxO1 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019;509(4):1021-7.
96. Lieber RL, Loren GJ, Friden J. In vivo measurement of human wrist extensor muscle sarcomere length changes. *Journal of neurophysiology*. 1994;71(3):874-81.
 97. Chleboun G, Patel T, Lieber R. Skeletal muscle architecture and fiber-type distribution with the multiple bellies of the mouse extensor digitorum longus muscle. *Cells Tissues Organs*. 1997;159(2-3):147-54.
 98. Kellis E, Galanis N, Natsis K, Kapetanios G. Muscle architecture variations along the human semitendinosus and biceps femoris (long head) length. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2010;20(6):1237-43.
 99. Felder A, Ward SR, Lieber RL. Sarcomere length measurement permits high resolution normalization of muscle fiber length in architectural studies. *Journal of Experimental Biology*. 2005;208(17):3275-9.
 100. Ter Keurs H, Luff A, Luff SE. Force—Sarcomere-Length Relation and Filament Length in Rat Extensor Digitorum Muscle. *Contractile Mechanisms in Muscle*: Springer; 1984. p. 511-25.
 101. Powell PL, Roy RR, Kanim P, Bello MA, Edgerton VR. Predictability of skeletal muscle tension from architectural determinations in guinea pig hindlimbs. *Journal of Applied Physiology*. 1984;57(6):1715-21.
 102. Mendez J, Keys A, Anderson J, Grande F. Density of fat and bone mineral of the mammalian body. *Metabolism*. 1960;9:472-7.
 103. Ward SR, Lieber RL. Density and hydration of fresh and fixed human skeletal muscle. *Journal of biomechanics*. 2005;38(11):2317-20.
 104. Friden J, Sjöström M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *International journal of sports medicine*. 1983;4(03):170-6.
 105. Haeger RM, Rassier DE. Force enhancement after stretch of isolated myofibrils is increased by sarcomere length non-uniformities. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-8.
 106. Hayran M. Sağlık araştırmaları için temel istatistik: Omega Araştırma; 2011.
 107. Morgan DL, Talbot JA. The addition of sarcomeres in series is the main protective mechanism following eccentric exercise. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*. 2002;2(03n04):421-31.
 108. Schwartz MA. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(12):a005066.
 109. Covert CA, Alexander MP, Petronis JJ, Davis DS. Comparison of ballistic and static stretching on hamstring muscle length using an equal stretching dose. *J Strength Cond Res*. 2010;24(11):3008-14.
 110. Van Dyke JM, Bain JL, Riley DA. Stretch-activated signaling is modulated by stretch magnitude and contraction. *Muscle Nerve*. 2014;49(1):98-107.
 111. Peixinho CC, Martins NS, de Oliveira LF, Machado JC. Structural adaptations of rat lateral gastrocnemius muscle-tendon complex to a chronic stretching program and their quantification based on ultrasound biomicroscopy and optical microscopic images. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2014;29(1):57-62.
 112. Baroni BM, Geremia JM, Rodrigues R, De Azevedo Franke R, Karamanidis K, Vaz MA. Muscle architecture adaptations to knee extensor eccentric training: rectus femoris vs. vastus lateralis. *Muscle & nerve*. 2013;48(4):498-506.

113. Poulsen JB, Møller K, Jensen CV, Weisdorf S, Kehlet H, Perner A. Effect of transcutaneous electrical muscle stimulation on muscle volume in patients with septic shock. *Critical care medicine*. 2011;39(3):456-61.
114. Maffiuletti NA, Roig M, Karatzanos E, Nanas S. Neuromuscular electrical stimulation for preventing skeletal-muscle weakness and wasting in critically ill patients: a systematic review. *BMC medicine*. 2013;11(1):1-10.
115. Tsutaki A, Ogasawara R, Kobayashi K, Lee K, Kouzaki K, Nakazato K. Effect of intermittent low-frequency electrical stimulation on the rat gastrocnemius muscle. *BioMed research international*. 2013;2013.
116. Mancinelli R, Toniolo L, Di Filippo ES, Doria C, Marrone M, Maroni CR, et al. Neuromuscular Electrical Stimulation Induces Skeletal Muscle Fiber Remodeling and Specific Gene Expression Profile in Healthy Elderly. *Frontiers in Physiology*. 2019;10(1459).
117. Tomori K, Kobayash R, Koseki T, Ohta Y. Effect of neuromuscular electrical stimulation of denervated muscle on the mRNA expression of IGFs in rat skeletal muscle and sciatic nerve. *Journal of Physical Therapy Science*. 2009;21(3):269-73.
118. Vaz MA, Baroni BM, Geremia JM, Lanferdini FJ, Mayer A, Arampatzis A, et al. Neuromuscular electrical stimulation (NMES) reduces structural and functional losses of quadriceps muscle and improves health status in patients with knee osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research*. 2013;31(4):511-6.
119. da Silva CFG, e Silva FXdL, Vianna KB, dos Santos Oliveira G, Vaz MA, Baroni BM. Eccentric training combined to neuromuscular electrical stimulation is not superior to eccentric training alone for quadriceps strengthening in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2018;22(6):502-11.
120. Lieber RL, Fridén J. Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*. 2000;23(11):1647-66.
121. Mackey AL, Brandstetter S, Schjerling P, Bojsen-Moller J, Qvortrup K, Pedersen MM, et al. Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. *The FASEB Journal*. 2011;25(6):1943-59.
122. Mackey AL, Bojsen-Moller J, Qvortrup K, Langberg H, Suetta C, Kalliokoski KK, et al. Evidence of skeletal muscle damage following electrically stimulated isometric muscle contractions in humans. *Journal of Applied Physiology*. 2008;105(5):1620-7.
123. Fouré A, Nosaka K, Wegrzyk J, Duhamel G, Le Troter A, Boudinet H, et al. Time course of central and peripheral alterations after isometric neuromuscular electrical stimulation-induced muscle damage. *PLoS One*. 2014;9(9):e107298.
124. Fouré A, Duhamel G, Wegrzyk J, Boudinet H, Mattei J-P, Le Troter A, et al. Heterogeneity of muscle damage induced by electrostimulation: a multimodal MRI study. *Med Sci Sports Exerc*. 2015;47(1):166-75.
125. Vanderthommen M, Chamayou R, Demoulin C, Crielaard JM, Croisier JL. Protection against muscle damage induced by electrical stimulation: efficiency of a preconditioning programme. *Clinical Physiology And Functional Imaging*. 2015;35(4):267-74.

126. Williams P, Watt P, Bicik V, Goldspink G. Effect of stretch combined with electrical stimulation on the type of sarcomeres produced at the ends of muscle fibers. *Exp Neurol*. 1986;93(3):500-9.
127. Kruse A, Rivares C, Weide G, Tilp M, Jaspers RT. Stimuli for Adaptations in Muscle Length and the Length Range of Active Force Exertion-A Narrative Review. *Front Physiol*. 2021;12:742034.
128. Van Dyke JM, Bain JL, Riley DA. Preserving sarcomere number after tenotomy requires stretch and contraction. *Muscle Nerve*. 2012;45(3):367-75.
129. Pretorius D, Kahn-Krell AM, LaBarge WC, Lou X, Zhang J. Engineering of thick human functional myocardium via static stretching and electrical stimulation. *iScience*. 2022;25(3):103824.
130. Friedrich O, Both M, Weber C, Schürmann S, Teichmann M, Von Wegner F, et al. Microarchitecture is severely compromised but motor protein function is preserved in dystrophic mdx skeletal muscle. *Biophysical journal*. 2010;98(4):606-16.
131. Tiegs OW. Observations on the structure of striated muscle fibre. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 1934;116(796):38-54.
132. Dix DJ, Eisenberg BR. Myosin mRNA accumulation and myofibrillogenesis at the myotendinous junction of stretched muscle fibers. *The Journal of cell biology*. 1990;111(5):1885-94.
133. Goldstein MA, Michael LH, Schroeter J, Sass R. Structural states in the Z band of skeletal muscle correlate with states of active and passive tension. *The Journal of general physiology*. 1988;92(1):113-9.
134. KILIÇ O, BUBER Üİ. Kalp Kapak Hastalığında Sistemik Enflamasyon İndeksi ve Nabız Basınç İndeksi Yoğun Bakım Ünitesi Mortalitesini Öngörür Mü? *MN Cardiology/MN Kardiyoloji*. 2022;29(3).
135. Wu S, Shi X, Zhou Q, Duan X, Zhang X, Guo H. The association between systemic immune-inflammation index and all-cause mortality in acute ischemic stroke patients: analysis from the MIMIC-IV database. *Emergency Medicine International*. 2022;2022:1-10.
136. Yılmaz H, Kazezoğlu C, GEDİKBAŞI A. The Predictive Value of Systemic Immune Inflammation Index in Patients Hospitalized in the Intensive Care Unit Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastalarda Sistemik İmmün Enflamasyon İndeksinin Prediktif Değeri. *Medical Journal of Bakirkoy*. 2022;18(3).
137. Jindrich DL, Besier TF, Lloyd DG. A hypothesis for the function of braking forces during running turns. *Journal of biomechanics*. 2006;39(9):1611-20.
138. Proske U, Morgan DL. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *The Journal of physiology*. 2001;537(2):333-45.
139. Liu H, Garrett WE, Moorman CT, Yu B. Injury rate, mechanism, and risk factors of hamstring strain injuries in sports: A review of the literature. *Journal of sport and health science*. 2012;1(2):92-101.
140. Elliott MC, Zarins B, Powell JW, Kenyon CD. Hamstring muscle strains in professional football players: a 10-year review. *The American journal of sports medicine*. 2011;39(4):843-50.
141. Brooks JH, Fuller CW, Kemp SP, Reddin DB. Incidence, risk, and prevention of hamstring muscle injuries in professional rugby union. *The American journal of sports medicine*. 2006;34(8):1297-306.

142. Timmins RG, Shield AJ, Williams MD, Lorenzen C, Opar DA. Architectural adaptations of muscle to training and injury: a narrative review outlining the contributions by fascicle length, pennation angle and muscle thickness. *British journal of sports medicine*. 2016;50(23):1467-72.
143. Ward SR, Hentzen ER, Smallwood LH, Eastlack RK, Burns KA, Fithian DC, et al. Rotator cuff muscle architecture: implications for glenohumeral stability. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2006;448:157-63.
144. Mathewson MA, Lieber RL. Pathophysiology of muscle contractures in cerebral palsy. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*. 2015;26(1):57-67.
145. De Jaeger D, Joumaa V, Herzog W. Intermittent stretch training of rabbit plantarflexor muscles increases soleus mass and serial sarcomere number. *Journal of Applied Physiology*. 2015;118(12):1467-73.



8. EKLER

EK 1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul İzinleri



BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 93773921-
KONU: Etik Kurul Kararı

19/06/2019

Öğr. Gör. Nehir UÇAR
MAKÜ, Burdur Sağlık Hizmetleri MYO

"Sıçanlarda Nöromusküler Elektrik Stimülasyonunun İskelet Kasının Mimari Özellikleri Üzerine Etkisi" konulu projeniz Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından **19.06.2019** tarih ve **525** sayılı karar ile uygun bulunmuştur. Kararın bir örneği ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
MAKÜ-HADYЕК Başkanı

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
19.06.2019	66	525

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 19 HAZİRAN 2019 tarihinde Saat 10.30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır:

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Burdur Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğr. Gör. Nehir UÇAR'ın yürütücü ve Dr. Öğr. Üyesi Murat A. KUŞ, Doç.Dr. Tüzün FIRAT ve Prof. Dr. Hakan ÖNER'in yardımcı araştırmacı olarak görev aldığı **"Sıçanlarda Nöromuskuler Elektrik Stimülasyonunun İskelet Kasının Mimari Özellikleri Üzerine Etkisi"** başlıklı çalışma,

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Rat (Wistar albino)	E	18	8-9 haftalık/ 250-300gr

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Prof.Dr. Özlem ÖZMEN BAŞKAN	Prof.Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU BAŞKAN VEKİLİ	Prof.Dr. Asım KART ÜYE
Prof.Dr. Dilek ÖZTÜRK ÜYE	Prof.Dr. Deniz İNNAL ÜYE	Dr.Öğr.Üyesi Yusuf Sinan ŞİRİN ÜYE
Dr.Öğr.Üyesi Savaş Volkan GENÇ ÜYE	Dr.Öğr.Üyesi Mümin POLAT ÜYE	Dr. Süleyman FAKİ ÜYE
Ömer ONGUN ÜYE	Vet. Hek. Simge GARLI ÜYE	

Evrak Tarih ve Sayısı: 14/01/2021-E.2494



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : E-93773921-020-2494
Konu : Olurlar, Onaylar

SAYIN ÖĞR.GÖR. NEHİR UÇAR

19.06.2019 tarihli **525** sayılı karar ile kabul edilen **"Sıçanlarda Nöromuskuler Elektrik Stimülasyonunun İskelet Kasının Mimari Özellikleri Üzerine Etkisi"** isimli projede farklı açılardan NMES uygulaması yapılan kasların mimari değerlendirmelerinin grup 1 ve kontrol 1'deki kaslar çıkarılırken diz 900, ayak bileği plantar fleksiyonda; grup 2 ve kontrol 2'deki kaslar için ise diz ve ayak bileği 900 de pozisyonlanarak çıkarılmasının daha doğru olması sebebiyle 6 adet 9-10 haftalık Wistar albino erkek sıçandan oluşan bir kontrol grubunun daha çalışmaya eklenmesi ile ilgili dilekçeniz Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından **13.01.2021** tarih ve **715** sayılı karar ile uygun bulunmuştur. Kararın bir örneği ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Kurul Başkanı

Belge Doğrulama Kodu :BE6LB2Z2J

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Adresi :

https://ebys.mehmetakif.edu.tr/enVision/Validate_Doc.aspx

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Sekreterliği Veteriner Fakültesi,

Zemin Kat, İstiklal Yerleşkesi, 15030, Burdur

Telefon: +90 248 213 20 01 Faks: +90 248 212 27 18

e-Posta : hadyek@mehmetakif.edu.tr Elektronik Ağ: <http://hadyek.mehmetakif.edu.tr>

Kep Adresi : maku@hs01.kep.tr

Evrak Pin Kodu: 92191



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK 2. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

Uçar, N., Öner, H., Kuş, M. A., Karaca, H., & Fırat, T. (2023). The effect of neuromuscular electrical stimulation applied at different muscle lengths on muscle architecture and sarcomere morphology in rats. *The Anatomical Record*.



EK 3. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

SIÇANLARDA NÖROMUSKULER ELEKTRİK
STİMÜLASYONUNUN İSKELET KASININ MİMARİ ÖZELLİKLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ-NEHİR UÇAR-69 SAYFA

ORJİNALLİK RAPORU

%6	%4	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	DOĞRUMAN, Hüsnüye, CERİT, Harun, UZUNÖREN, Nuray and TAŞKIN, Elif. "Siçanlarda (genç erişkin) esbiothrin'in solunum yoluyla uygulanmasının bazı enzim düzeyleri üzerine etkileri", TUBITAK, 2000. Yayın	%1
2	temga.tip.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	

EK 4. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Nehir Uçar
 Ödev başlığı: Sıçanlarda Nöromuskuler Elektrik Stimülasyonunun İskelet K...
 Gönderi Başlığı: SIÇANLARDA NÖROMUSKULER ELEKTRİK STİMÜLASYONUNU...
 Dosya adı: Nehir_U_AR1_Turnitin_.docx.docx
 Dosya boyutu: 19.22M
 Sayfa sayısı: 69
 Kelime sayısı: 9,864
 Karakter sayısı: 65,764
 Gönderim Tarihi: 31-Eki-2023 01:29ÖÖ (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2212446623



9. ÖZGEÇMİŞ

