

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKELET KASI ATROFİSİ
MODELİNDE MİTOKONDİRİ TRANSPLANTASYONU VE EGZERSİZİN
ETKİLERİ**

Gökhan Burçin KUBAT

**Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKELET KASI ATROFİSİ
MODELİNDE MİTOKONDİRİ TRANSPLANTASYONU VE EGZERSİZİN
ETKİLERİ

Gökhan Burçin KUBAT

Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meltem TUNCER

ANKARA
2023

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ****SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****DOKTORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKELET KASI ATROFİSİ
MODELİNDE MİTOKONDİRİ TRANSPLANTASYONU ve EGZERSİZİN ETKİLERİ****Öğrenci: Gökhan Burçin Kubat****Danışman: Doç. Dr. Meltem Tuncer**

Bu tez çalışması 22.05.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Mehmet ÖZLER*
(Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi)

Üye: *Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN*
(Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi)

Üye: *Prof. Dr. Tahir HAZIR*
(Hacettepe Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi)

Üye: *Prof. Dr. Ayşen ERDEM*
(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Süleyman BULUT*
(Hacettepe Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi)

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

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ 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 tezimin 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⁾

22/05/2023

Gökhan Burçin KUBAT

¹“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 **danışmanın** 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 **danışmanın** 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 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 **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

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

Gökhan Burçin KUBAT

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince benimle ilgilenen ve bu tezin başarılı bir şekilde sonuca ulaşmasında bilgi ve tecrübelerinden yararlanma olanağı bulduğum tez danışmanım Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi değerli hocam Doç. Dr. Meltem TUNCER'e,

Tezime yaptığı katkılarıyla ve tez izleme komitesi/tez savunma jürimde bulunan hem akademik olarak hem de insan olarak çok değer verdiğim Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Dekan Yardımcısı ve Fizyoloji A.B.D. Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet ÖZLER'e,

Tez izleme komitem ve tez savunma jürimde yer alan Hacettepe Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Dekan V. değerli hocam Prof. Dr. Tahir HAZIR'a,

Tez savunma jürimde yer alan değerli hocalarım Prof. Dr. Ayşen ERDEM'e, Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Süleyman BULUT'a,

Tez çalışmam süresince her aşamada yanımda olan, aynı yolda yürüdüğüm ve mitokondrinin gücüne inanan kardeşlerim Dr. Öner ÜLGER ve Arş. Gör. Özbeyen ATALAY'a,

Tez çalışmam boyunca her aşamada hiçbir yardımını esirgemeyen beraber çalıştığım arkadaşlarım Öğr. Gör. İbrahim TÜRKEK ve Arş. Gör. Berkay ÖZERKLİĞ'e,

Tez çalışmamın histokimyasal değerlendirmelerini yapan ve her zaman destek olan Uzm. Dr. Ertuğrul ÇELİK'e,

Tezim boyunca manevi olarak yanımda olan ve bana sürekli destek veren Melike ÇELİK'e,

Bu günlere gelmemi sağlayan ve hayatım boyunca yanımda olan canım Ailem'e,

Sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Kubat, GB. Doksorubisin ile Oluşturulan Deneysel İskelet Kası Atrofisi Modelinde Mitokondri Transplantasyonu ve Egzersizin Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spor Bilimleri ve Teknolojisi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Doksorubisin (DOX), birçok farklı kanser türünü tedavi etmek için kullanılan ama toksik etkilere sahip bir kanser ilacıdır. Bu toksik etkisi nedeniyle iskelet kası atrofisine yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Egzersiz DOX'un antineoplastik özelliklerini etkilemeden iskelet kası atrofisine karşı özellikle mitokondriyal yollar üzerinden etki etmektedir. Bununla birlikte mitokondri transplantasyonu, toksisiteyi, nörodejeneratif bozuklukları, kalp, böbrek, karaciğer hasarlarını azaltabilirken, iskelet kası atrofisi üzerindeki etkileri az bilinmektedir. Çalışmanın amacı, sıçanlarda DOX ile oluşturulan iskelet kası atrofisi modelinde mitokondri transplantasyonu ve egzersizin iyileşmeye olan katkılarının değerlendirilmesidir. Çalışmada erkek *Sprague Dawley* sıçanlar; kontrol (K), DOX (D), DOX ve mitokondri (DM), DOX ve egzersiz (DE), DOX, egzersiz ve mitokondri (DEM) gruplarına (n=8/grup) ayrılmıştır. Egzersiz grubundaki (DE) sıçanlara 10 günlük koşu egzersizi yaptırılmış ve mitokondri grubuna (DM) DOX enjeksiyonu öncesinde birer gün arayla 2 doz mitokondri transplantasyonu yapılmıştır. Egzersiz ve mitokondri grubuna (DEM) ise hem egzersiz hem de mitokondri transplantasyonu birlikte uygulanmıştır. Kas atrofisi oluşturmak için D, DM, DE ve DEM gruplarına 20 mg/kg DOX enjeksiyonu yapılmıştır. İzole edilen mitokondrilerin membran bütünlüğü ve potansiyeli için *MitoTracker Red CMXRos*, *MitoSpy Green FM* ve JC-1 analizleri yapılmıştır. *Tibialis anterior* kasında, kas ağırlıkları ölçümü, histolojik analizler (H-E, SDH ve PAS), immünohistokimyasal analizler (Kaspaz-3, NF- κ B, DRP-1 ve MFN-2), kan örnekleri biyokimyasal analizleri (üre, LDH, ALT ve AST) ve oksidatif stres analizleri (TAS ve TOS) yapıldı. Grupların *tibialis anterior* kas ağırlıkları karşılaştırıldığında DE ve DEM grupları K grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($P < 0,05$). Son vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında DM, DE, DEM grupları D grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($P < 0,05$). *Tibialis anterior* enine kesit alanı için D grubu K grubuna göre azalmış, DE ve DEM grupları D grubuna göre artmıştır ($P < 0,05$). SDH düzeyleri D grubuna göre tüm gruplarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Üre düzeyleri D ve DM gruplarında K grubuna göre yüksek ama DE grubunda ise anlamlı derecede düşük ($P < 0,05$), ALT düzeyleri ise DM, DE, DEM gruplarında K grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Kaspaz-3 düzeyi D ve DM grubunda DE ve DEM gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($P < 0,05$), NF- κ B düzeyi ise D grubunda K grubuna göre yüksek iken DM, DE, DEM gruplarında D grubuna göre düşük bulunmuştur ($P < 0,05$). DRP-1 düzeyi D ve DE gruplarında K grubuna göre yüksek ama DM ve DEM gruplarında ise D grubuna göre düşük ($P < 0,05$), MFN-2 düzeyi DM ve DE gruplarında K grubuna göre yüksek ve DE grubunda D grubuna göre de yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). TOS analizinde DE grubu K ve DM grubuna göre düşük iken TAS analizinde DE ve DEM grupları K grubuna göre yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu sonuçlar egzersizin kas atrofisinin önlenmesindeki rolünün önemli olduğunu ve mitokondri transplantasyonu ile birlikte etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, mitokondri, egzersiz, sıçanlarda iskelet kası atrofisi, mitokondri transplantasyonu

ABSTRACT

Kubat, GB. Effects of Exercise and Mitochondrial Transplantation in an Experimental Model of Doxorubicin-Induced Skeletal Muscle Atrophy, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Doctor of Philosophy Thesis in Sport Sciences and Technology, Ankara, 2023. Doxorubicin (DOX) is a chemotherapy drug that serves to treat many different forms of cancer but has hazardous side effects. It has been demonstrated in several studies that its toxic effect induces skeletal muscle atrophy. Exercise prevents skeletal muscle atrophy, particularly via mitochondrial pathways, without altering DOX's antineoplastic effects. While mitochondria transplantation may mitigate toxicity, neurological disorders, heart, kidney, and liver damage, its effects on skeletal muscle atrophy remain unknown. The goal of the study was to assess how exercise and mitochondrial transplantation affected recovery in a rat model of DOX-induced skeletal muscle atrophy. In this study, male Sprague Dawley rats were divided into control (K), DOX (D), DOX and mitochondria (DM), DOX and exercise (DE), DOX, exercise and mitochondria (DEM) groups (n=8/group). Before receiving a dosage of DOX, the rats in the exercise group (DE) underwent a 10-day running exercise whereas those in the mitochondrial group (DM) received two doses of mitochondrial transplantation. In the exercise and mitochondria group (DEM), both exercise and mitochondria transplantation were applied together. The D, DM, DE, and DEM groups received a 20 mg/kg DOX injection to induce muscular atrophy. MitoTracker Red CMXRos, MitoSpy Green FM, and JC-1 analysis were performed for the membrane integrity and potential of the isolated mitochondria. In the tibialis anterior muscle, measurement of muscle weights, histological analysis (H-E, SDH, and PAS), immunohistochemical analysis (Caspase-3, NF- κ B, DRP-1, and MFN-2), biochemical analysis of blood samples (urea, LDH, ALT, and AST) and oxidative stress analysis (TAS and TOS) were performed. When the tibialis anterior muscle weights of the groups were compared DE and DEM groups increased significantly compared to the K group ($P < 0.05$). When the final body weights were compared, the DM, DE, and DEM groups increased significantly compared to the D group ($P < 0.05$). For the tibialis anterior cross-sectional area, the D group decreased compared to the K group, DE and DEM groups increased compared to the D group ($P < 0.05$). SDH levels were found to be significantly higher in all groups compared to the group D ($P < 0.05$). Urea levels were higher in D and DM groups compared to the K group, but significantly lower in the DE group ($P < 0.05$), and ALT levels were significantly higher in DM, DE, DEM groups compared to the K group ($P < 0.05$). Caspase-3 level was found to be significantly higher in D and DM groups compared to DE and DEM groups ($P < 0.05$), while NF- κ B level was higher in D group than K group, and lower in DM, DE, DEM groups compared to D group ($P < 0.05$). DRP-1 level was higher in D and DE groups than K group and was lower in DM and DEM groups than D group ($P < 0.05$). MFN-2 level was higher in DM and DE groups than the K group and was higher in the DE group than the D group ($P < 0.05$). DE group was lower than K and DM groups in the TOS analysis, while DE and DEM groups were higher than the K group in the TAS analysis ($P < 0.05$). These results demonstrated that the role of exercise in preventing muscle atrophy is important, but it is more effective with mitochondria transplantation.

Keywords: Doxorubicin, mitochondria, exercise, skeletal muscle atrophy in rats, mitochondria transplantation

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	xiii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Araştırmanın Amaçları	3
1.2. Araştırmanın Hipotezleri	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Doksorubisin (DOX)	5
2.1.1. Doksorubisinin Tarihçesi ve Kimyasal Yapısı	5
2.1.2. Doksorubisinin Etki Mekanizması	6
2.1.3. Doksorubisin ve İskelet Kası Atrofisi	7
2.1.4. Doksorubisin ve Mitokondriyal Hasar	9
2.2. İskelet Kası Atrofisi	12
2.2.1. Kullanılmama ile İndüklenen İskelet Kası Atrofisi	13
2.2.2. Kaşeksi ile İndüklenen İskelet Kası Atrofisi	14
2.3. Egzersiz ve Kas Atrofisi	16
2.3.1. Doksorubisin ile İndüklenen Kas Atrofisinde Egzersizin Etkileri	18
2.4. Mitokondri Transplantasyonu/Transferi	20
2.4.1. Hücreler Arası Doğal Mitokondri Transferi	21
2.4.2. Yapay Mitokondri Transferi/Transplantasyonu	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32

3.1. Deney Hayvanları	32
3.2. Deney Grupları	32
3.3. Egzersiz Protokolü	33
3.4. Doksorubisin Enjeksiyonu	34
3.5. Kas Dokusundan Mitokondri İzolasyonu ve Mitokondri Transplantasyonu	34
3.6. İzole Edilen Mitokondrilerin Membran Potansiyeli Analizi	35
3.7. İzole Edilen Mitokondrilerin Membran Bütünlüğü Analizi	36
3.8. İzole Edilen Mitokondrilerin Protein Analizi	36
3.9. Histolojik Analizler	36
3.9.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Enine Kesit Alanı Ölçümü	36
3.9.2. <i>Periyodik Asit-Schiff (PAS)</i> Boyaması ile Lif Glikojen Oranı	37
3.9.3. <i>Süksinat Dehidrogenaz (SDH)</i> Boyaması ile Mitokondriyal Enzim Aktivitesi	37
3.10. Biyokimyasal Analizler	38
3.10.1. Kan Örnekleri Analizleri	38
3.10.2. Kas Doku Örnekleri Analizleri	38
3.11. İmmünohistokimyasal Analizler	40
3.12. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. İzole Edilen Mitokondrilerin Membran Bütünlüğü ve İşlevlerinin Analizleri	42
4.1.1. İzole Edilen Mitokondrilerin Floresan Mikroskop ile Membran Potansiyeli Analizleri	42
4.1.2. Kas İçi <i>MitoTracker Red CMXRos</i> ile Mitokondri Boyaması ve Floresan Mikroskop Analizleri	43
4.1.3. İzole Edilen Mitokondrilerin <i>MitoTracker Red CMXRos</i> ve <i>MitoSpy Green FM</i> ile Boyanması ve Floresan Mikroskop Analizleri	44
4.1.4. İzole Edilen Mitokondrilerin Protein Ölçümleri	44
4.2. Vücut ve Kas Ağırlığı Bulguları	44

4.3. Histolojik Bulgular	45
4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Lif Enine Kesit Alanı Analizleri	45
4.3.2. <i>Periyodik Asit-Schiff</i> (PAS) Boyaması ile Lif Glikojen Oranı	48
4.3.3. <i>Süksinat Dehidrogenaz</i> (SDH) Boyaması ile Mitokondriyal Enzim Aktivitesi	50
4.4. Biyokimyasal Bulgular	53
4.4.1. Kan Örneklerine Ait Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular	53
4.4.2. Kas Doku Örneklerine Ait Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular	57
4.5. İmmünohistokimyasal Analizlerden Elde Edilen Bulgular	59
4.5.1. Kaspaz-3 Analizi Bulguları	59
4.5.2. Nükleer Faktör-Kappa B (NF- κ B) Analizi Bulguları	61
4.5.3. Dinamin İlişkili Protein (DRP-1) Analizi Bulguları	63
4.5.4. Mitofusin 2 (MFN-2) Analizi Bulguları	65
5. TARTIŞMA	68
5.1. İzole Mitokondrilerin Kalite Kontrol Analizleri	68
5.2. Doksorubisinin (DOX) İskelet Kası Üzerindeki Etkisi	70
5.3. İskelet Kası Atrofisinde Mitokondri Transplantasyonunun Etkisi	72
5.4. İskelet Kası Atrofisinde Egzersizin Etkisi	74
5.5. İskelet Kası Atrofisinde Egzersiz ve Mitokondri Transplantasyonunun Birlikte Etkisi	77
5.6. DOX, Egzersiz ve Mitokondri Transplantasyonunun Sistemik Etkileri	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
7. KAYNAKLAR	84
8. EKLER	100
Ek-1: Etik Kurul İzni	
Ek-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
Ek-3: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGELER VE KISALTMALAR

Akt	Protein kinaz B
Atg	Otofaji-iliskili
ALT	Alanin aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	Adenozin monofosfat ile aktifleştirilen protein kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
AST	Aspartat aminotransferaz
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BNIP3	BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa protein etkileşimli protein 3
BSA	<i>Bovine</i> serum albümin
BVA	Başlangıç vücut ağırlığı
CCl ₄	Karbon tetraklorür
CK	Kreatin kinaz
CPT1a	Karnitin palmitoiltransferaz 1a
CRP	C reaktif protein
CuSO ₄	Bakır sülfat
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOX	Doksorubisin
DRP-1	Dinamin ilişkili protein
EDL	<i>Ekstansör digitorum longus</i>
EV	Hücre dışı veziküller
ERR α	Östrojenle ilişkili reseptör α
FoxO1	<i>Forkhead box O1</i>
FoxO3a	<i>Forkhead box O3a</i>
GJC	Yarık bağlantı kanalları
GLUT-4	Glukoz taşıyıcı tip 4
GSH	Glutatyon

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HNE	Hidroksinonenal
HRP	<i>Horseradish</i> peroksidaz
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-6	İnterlökin-6
IRS-1	İnsülin reseptörü substratı-1
IQR	<i>Interquartile range</i>
JC-1	<i>5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzi-midazolylcarbocyanineiodide</i>
LC3	Hafif zincir 3
LDH	Laktat dehidrogenaz
MAFbx	<i>Atrogin-1 (Muscle atrophy F-box)</i>
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MFN-2	Mitofusin 2
MHC	Protein miyozin ağır zinciri
MKH	Mezenkimal kök hücre
MMP	Mitokondri membran potansiyeli
MTG	<i>MitoTracker Green</i>
mTOR	Memelilerde rapamisinin hedefi
MRF	Miyojenik düzenleyici faktörü
mRNA	Haberci-RNA
mtDNA	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
MuRF1	<i>Muscle RING-finger protein-1</i>
MyoD	Miyoblast belirleme proteini
NAC	N-asetilsistein
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat

NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i> klorür
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
NIS	<i>Nikon imaging system</i>
NLRP3	NLR ailesi pirin alanı içeren 3
O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyonu
OH•	Hidroksil radikali
Olig2	Oligodendrosit transkripsiyon faktörü
OPA-1	Optik Atrofi 1
PAX7	<i>Protein-paired box 7</i>
PBS	Fosfat tampon <i>salin</i>
Pep-1	<i>Penetrating peptide-1</i>
PGC-1α	Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatör
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinaz
REDD1	<i>Regulated in DNA damage and development 1</i>
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDH	Süksinat dehidrogenaz
sGC	Çözünebilir guanilat siklaz
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
SVA	Son vücut ağırlığı
TA	<i>Tibialis anterior</i>
TAS	Total antioksidan seviyesi
TOS	Total oksidan seviyesi
TGFβ	Dönüştürücü büyüme faktörü β
TLR4	<i>Toll</i> benzeri reseptör 4
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TNT	Tünel oluşturan nanotüpler
TOP2B	Topoizomeraz IIβ
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UPS	Ubikülin proteazom sistemi

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Doksorubisinin kimyasal yapısı	6
2.2.	Kemoterapinin etkilediği sinyal yolları	7
2.3.	Doksorubisin ve mitokondri hasar yolları	12
2.4.	Egzersizin kas atrofisi üzerindeki etkileri	18
2.5.	Egzersizin doksorubisin ile indüklenen kas atrofisi üzerindeki etkileri	20
2.6.	Mitokondriyal transplantasyon/transfer mekanizmaları	21
2.7.	Hücreler arası doğal mitokondri transferi mekanizmaları	24
3.1.	Deney protokolü	33
3.2.	Sıçanlar için üretilmiş motorize koşu bandı	34
3.3.	<i>Tibialis anterior</i> kasına mitokondri transplantasyonu	35
4.1.	İzole mitokondrilerin JC-1 ile boyandıktan sonra floresan mikroskop ile gösterilmesi	42
4.2.	Mitokondri izolasyonu için kaynak olarak kullanılan <i>biceps femoris</i> kası içindeki mitokondrilerin floresan mikroskop ile gösterilmesi	43
4.3.	İzole edilen mitokondrilerin floresan mikroskop ile gösterilmesi	44
4.4.	<i>Tibialis anterior</i> kasının enine kesit alanı görüntüleri	46
4.5.	<i>Tibialis anterior</i> kasının enine kesit alanı analizleri	47
4.6.	<i>Tibialis anterior</i> kasının glikojen görüntüleri	49
4.7.	<i>Tibialis anterior</i> kasının glikojen analizleri	50
4.8.	<i>Tibialis anterior</i> kasının süksinat dehidrogenaz görüntüleri	51
4.9.	<i>Tibialis anterior</i> kasının süksinat dehidrogenaz analizleri	52
4.10.	Serum üre düzeyleri	54
4.11.	Serum laktat dehidrogenaz düzeyleri	55
4.12.	Serum alanin aminotransferaz düzeyleri	56
4.13.	Serum aspartat aminotransferaz düzeyleri	57

4.14.	Toplam antioksidan seviyesi	58
4.15.	Toplam oksidan seviyesi	59
4.16.	Kaspaz-3 görüntüleri	60
4.17.	Kaspaz-3 analizleri	61
4.18.	NF-κB görüntüleri	62
4.19.	NF-κB analizleri	63
4.20.	DRP-1 görüntüleri	64
4.21.	DRP-1 analizleri	65
4.22.	MFN-2 görüntüleri	66
4.23.	MFN-2 analizleri	67

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Kaspaz-3, NF- κ B, DRP-1 ve MFN-2 boyama yoğunlukları skorlama tablosu	40
4.1.	Vücut ve kas ağırlığı bulguları	45
4.2.	<i>Tibialis anterior</i> kasının enine kesit alanı analizleri	47
4.3.	<i>Tibialis anterior</i> kasının süksinat dehidrogenaz (SDH) (optik yoğunluk indeksi) analizleri	52
4.4.	Biyokimyasal bulgular	53

1. GİRİŞ

Doksorubisin (DOX), yumuşak doku, kemik sarkomları, meme, yumurtalık, mesane, tiroid kanserleri, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, *Hodgkin* lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılmaktadır (1, 2). Ancak DOX çeşitli kanser türlerinde kullanılırken bir dezavantaj olarak farklı doku ve organlara da zarar vermektedir. DOX'un sitotoksik etkileri, topoizomera II inhibisyonu, sitokrom c'nin mitokondriden salınması, DNA'ya bağlanma, DNA çözülmesi/ayrılması, alkilasyonda artış ve oksidatif stres gibi belirli süreçleri içerir (3). DOX'un başka bir etki mekanizması ise, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonları ($O_2^{\bullet-}$) gibi serbest radikaller üreterek aşırı reaktif oksijen türlerini (ROT) üretme kabiliyetidir. Bunlar apoptoz yoluyla tümör hücresi ölümüyle sonuçlanan oksidatif strese ile hücre zarı lipidlerine ve proteinlerine zarar verir (4).

DOX tedavisi, kanser hastalarında yaşam kalitesini olumsuz etkileyen iskelet kası zayıflığı ve yorgunluğunun gelişmesine yol açar (5). Bu sitotoksik özelliği nedeniyle iskelet kası atrofisine yol açtığı çeşitli insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. DOX'un iskelet kası toksisitesindeki hücresel ve moleküler mekanizmalar, oksidatif stres yoluyla proteolitik ve apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkili olarak kontraktıl ve mitokondriyal işlev bozukluğudur (6). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kronik DOX tedavisine (2,5 mg/kg, haftada iki kez, toplam doz, 25 mg/kg) yanıt olarak vücut ağırlığında ve *gastroknemius* kütlesinde önemli bir azalma olduğu raporlanmıştır (7). Sıçanlarda DOX (24 mg/kg) ile tedaviye başladıktan 4 hafta sonra iskelet kası ve kalp kası kaybının hemen hemen aynı olduğu rapor edilmiştir (8).

DOX tedavisinin mitokondri hasarına neden olduğu tıp dünyasında bilinen bir gerçektir (9). Son araştırmalar, DOX kaynaklı mitokondriyal hasarın hücresel işlev bozukluğunu tetiklediğini göstermiştir (10). DOX uygulamasından sonra ROT üretiminin arttığı çeşitli çalışmalarda raporlanmıştır (11). ROT'ların artışı mitokondriyal yapıya ciddi şekilde zarar vererek, apoptoza ve kalp ve solunum kaslarında kasılmada azalmaya neden olarak kalp ve solunum işlev bozukluklarına neden olmaktadır (12, 13). Tek doz DOX uygulaması (20 mg/kg), mitokondriyal

kompleks I ve kompleks II'yi etkileyerek iskelet kasındaki mitokondriyal solunumu baskılar (14). 15 mg/kg'lık bir dozda DOX enjeksiyonu, iskelet kaslarındaki *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) apoptotik indeksini %583 ve Bax proteinini ise %111 oranında artırtığını göstermiştir (15). *Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama koaktivatör-1α* (PGC-1α), mitokondriyal biyogenez, anjiyogenez ve bir dereceye kadar kas hipertrofisini düzenler (16). PGC-1α, *AMP-activated protein kinase* (AMPK) α ile yakından ilişkili olduğu için, 15 mg/kg dozunda tek doz DOX uygulaması ile L6 miyositlerde 48 saat sonra AMPK α'nın fosforilasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (17).

DOX ile indüklenen iskelet kası atrofisi, farklı lif tiplerine sahip (oksidatif yapıya sahip tip I veya glikolitik yapıya sahip tip II kaslar) iskelet kaslarında ortaya çıkabilir. Egzersizin, hızlı kasılan glikolitik (*ekstansör digitorum longus*) kaslara kıyasla yavaş kasılan oksidatif (*soleus*) ve karma (diyafram) kasları daha iyi koruduğu görülmektedir (18). Egzersiz, oksidan tamponlama kapasitesini artırarak, endojen antioksidan enzimlerin aktivitesinde artışı indükleyerek DOX toksisitesini önleyebilir (19). DOX tedavisi ile birlikte egzersiz, sıçanların kalbinde ve *soleus* kasında mitokondriyal oksidatif solunum ve redoks dengesini korumuş ve erkek sıçanlarda *Muscle RING-finger protein-1* (MuRF1) sinyalini azaltmıştır (20). Dayanıklılık egzersizi, iskelet kasının antioksidan kapasitesini artırır, kası DOX kaynaklı oksidatif stresten ve otofaji genlerinin ifadesinden korur (21). Egzersiz, hem miyofibriler proteinler içindeki karbonil seviyelerinde hem de 4-hidroksinonenal (4-HNE)'nin kas proteinlerine konjugasyonunda azalma ile iskelet kası proteinlerini DOX kaynaklı oksidatif modifikasyonuna karşı korur (19).

Mitokondri transplantasyonu, mitokondri işlev bozukluğuna bağlı hastalıkların tedavisi için son yıllarda umut verici bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemin, insan klinik deneylerinde kardiyak iskemi-reperfüzyon tedavisinde yararlı olduğu bildirilmiştir ve ayrıca mitokondriyal işlev bozukluğuna bağlı kalp, böbrek, karaciğer, akciğerler, yaşlanma ve beyin hastalıklarını tedavi edici etkisi preklinik çalışmalarda gösterilmiştir. Mitokondri transplantasyonu, mitokondriyal işlevleri düzenlemek için sağlıklı ekzojen mitokondriyi hasarlı hücrelere veya dokulara transfer etmeye yarayan

son yıllarda sıkça kullanılmaya başlayan bir tekniktir (22). Mitokondri transplantasyonu ile ilgili iskelet kas hasarını hedef alan çok az sayıda araştırma yapılmıştır. Ayrıca bu çalışmalar hasar meydana geldikten sonra tedavi edici etkiyi araştırmıştır. Akut ekstremitte iskemisinde, arka bacak reperfüzyonundan sonra, mitokondri transplantasyonu ile *gastroknemius*, *soleus* ve *vastus medialis* kaslarında enfarktüs boyutu, apoptoz ve TUNEL-pozitif çekirdeklerde önemli bir azalma olduğu gösterilmiş olup mitokondri alan farelerde minimal kas hasarı gözlenmiştir (23). İskelet kası hasarı modelinde, mitokondri transplantasyonunun farelerde sistemik inflamasyonu artırmadığı gösterilmiştir. Yaralanmadan 7 gün sonra kas kütlesini düşürmediği ve kas kesitlerindeki kollajen ve diğer kasılmayan doku yüzdesinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Kas ağırlığı ve maksimal kas kuvvetinin, yaralanmadan 14 gün sonra kontrol seviyelerine geri döndüğü rapor edilmiştir (24). Dekametazon kaynaklı atrofi modelinde, mitokondri transplantasyonunun 1 haftada kas kütlesini 1,5 kat artırdığı ve laktat konsantrasyonunu 2,5 kat azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bir kas rejenerasyon belirteci olan *desmin* protein ifadesinin 2,3 kat arttığı ve kasa özgü ubikütin E3-ligazları *muscle atrophy F-box* (MAFbx) ve MuRF-1'in önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (25). Mitokondrinin önceden verilerek koruyucu etkileri açısından bir rapor bildirilmemiştir.

Mitokondri transplantasyonu, çeşitli mitokondri ilişkili hastalıklarda geniş bir uygulanabilirliğe sahip olup, şu andaki mevcut tedavi yaklaşımlarındaki sınırlılıkların üstesinden gelme potansiyeline sahiptir. Bu sonuçla tez çalışmasının amaçları ve hipotezleri aşağıda sunulmuştur.

1.1. Araştırmanın Amaçları

Bu tez çalışmasının ilk amacı, sıçanlarda doksorubisin (DOX) ile oluşturulan iskelet kası atrofisi modelinde mitokondri transplantasyonunun kas atrofisini engelleyip engellemediğini incelemektir. İkinci amacı olarak 10 gün boyunca yapılan koşu bandı egzersizinin kas atrofisinin önlenmesindeki etkisini incelemektir. Son olarak bu iki koruyucu uygulama olan mitokondri transplantasyonu ve egzersizin

birlikte kas atrofisi üzerindeki etkilerinin daha fazla olup olmadığının ortaya konmasıdır.

1.2. Araştırmanın Hipotezleri

H1: Sıçanlarda DOX uygulaması mitokondri işlev bozukluğuna, oksidatif strese ve inflamasyona bağlı iskelet kası atrofisine neden olur.

H2: Mitokondri transplantasyonu sıçanlarda DOX ile oluşturulan iskelet kası atrofisi modelinde iyileşmeye neden olur.

H3: Koşu bandı egzersizi sıçanlarda DOX ile oluşturulan iskelet kası atrofisi modelinde iyileşmeye neden olur.

H4: Mitokondri transplantasyonu uygulamasının DOX ile oluşturulan deneysel iskelet kası atrofisi modeli üzerindeki olumlu etkileri koşu bandı egzersizinin etkilerinden farklıdır.

H5: DOX ile oluşturulan deneysel iskelet kası atrofisi modelinde, mitokondri transplantasyonu ve koşu bandı egzersizinin birlikte uygulanmasının iyileştirici etkileri tek tek uygulanmalarından daha etkindir.

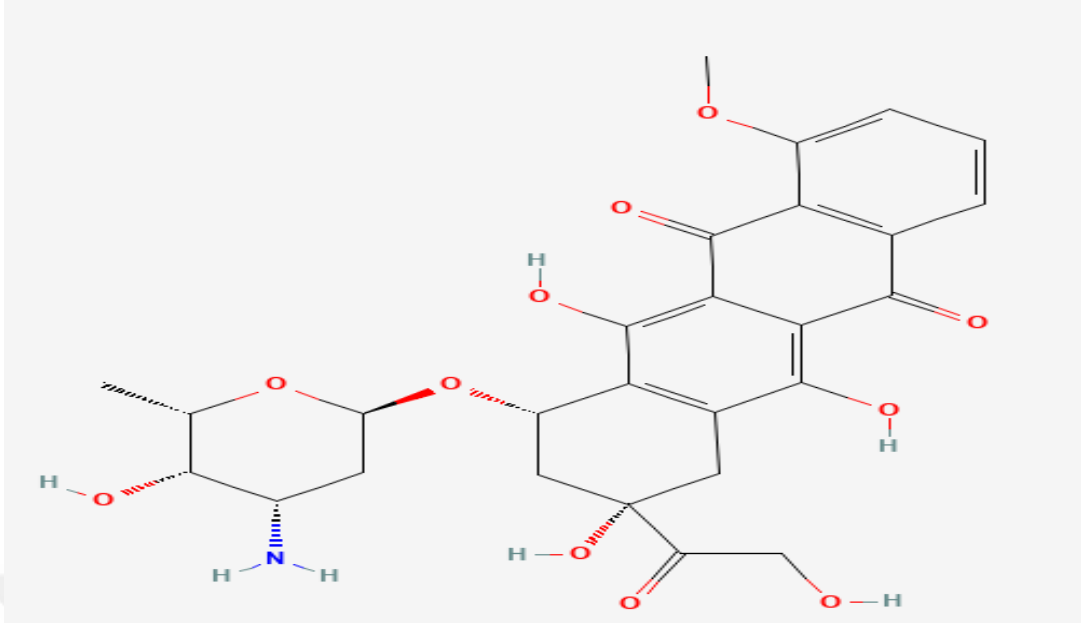
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doksorubisin (DOX)

Doksorubisin (DOX), kanser kemoterapisinde kullanılan *streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen (26) antrasiklin türevi bir antibiyotiktir (27). DOX, yumuşak doku, kemik sarkomları, meme, yumurtalık, mesane, tiroit kanserleri, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, *Hodgkin* lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılmaktadır (1, 2).

2.1.1. Doksorubisinin Tarihçesi ve Kimyasal Yapısı

Solid tümörler, lösemiler ve lenfomalar gibi çeşitli malignitelere karşı klinik onay alan ilk lipozomal kapsüllü anti-kanser ilacı doksorubisin HCl'dir (28). DOX'un molekül formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}HCl$ ve molekül ağırlığı 579,98 g/mol'dür. İlaç, aglikonik ve şeker kısımlarına sahip, seçici olmayan sınıf I antrasiklindir. Aglikon, kinin-hidrokinon bitişik gruplara sahip bir tetrasiklik halkadan, metoksi sübstitüent kısa yan zinciri ve ardından karbonil grubundan oluşur. Şeker bileşeni (*daunozamin* olarak da bilinir) halkalardan birine glikosidik bir bağla bağlıdır. Bu, bir 3-amino-2,3,4- trideoksi-L-fukosil parçasından oluşur (Şekil 2.1.) (29, 30).



Şekil 2.1. Doksorubisinin kimyasal yapısı.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 31703, Doxorubicin. Retrieved March 11, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin>.

2.1.2. Doksorubisinin Etki Mekanizması

DOX'un sitotoksik etkileri ile ilişkili olan topoizomerez II inhibisyonu, sitokrom c'nin mitokondriden salınması, DNA'ya bağlanma, DNA çözülmesi/ayrılması, alkilasyonda artış ve oksidatif strese yol açan serbest radikallerin oluşumu gibi belirli süreçler vardır (3).

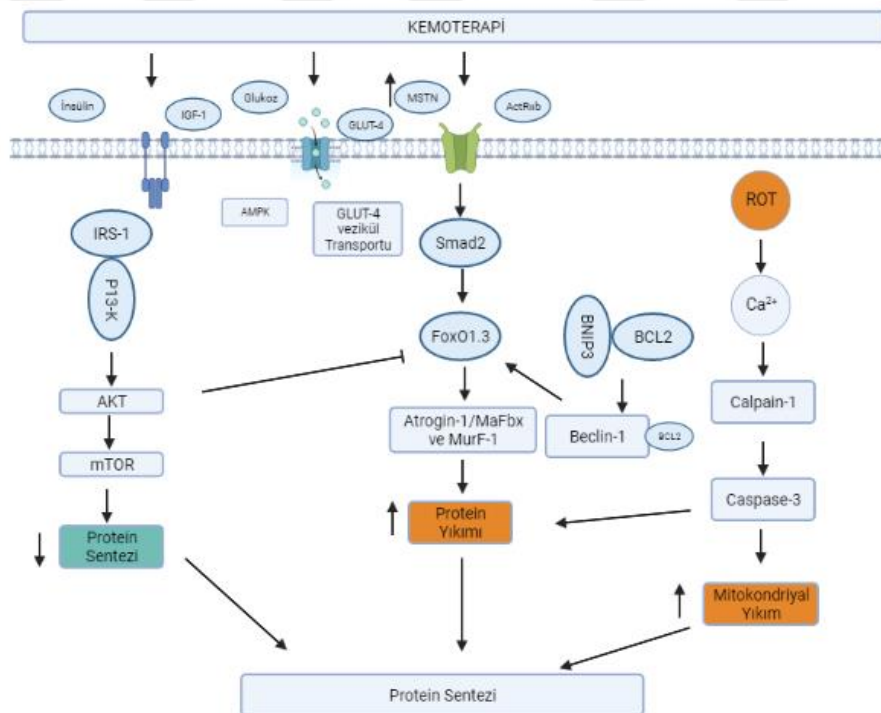
DOX, interkalasyon yoluyla DNA ile etkileşime girerek makromoleküler biyosentezi inhibe eder (31). Topoizomerez II, kanser hücrelerinin hayatta kalmasından ve bölünmesinden sorumludur. Bu nedenle, kanser hücreleri sağlıklı hücrelere göre DNA kırılmalarına karşı daha savunmasız olduğundan, DNA hasarına yol açan toksisite hayati önem taşır (32, 33). Bu ayrıca topoizomerez II enziminin ilerlemesini engeller ve transkripsiyon için DNA'daki süper sarmalları gevşetir (34). DOX, replikasyon için DNA zincirini kırdıktan sonra topoizomerez II kompleksini stabilize ederek DNA çift sarmalının yeniden kapanmasını önler ve böylece replikasyon sürecini durdurur (35).

DOX'un başka bir etki mekanizması, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonları ($O_2^{\bullet-}$) gibi serbest radikaller üreterek aşırı reaktif oksijen türlerini (ROT)

üretme kabiliyetidir. Bunlar apoptoz yoluyla tümör hücresi ölümüyle sonuçlanan oksidatif strese yol açabilen DNA hasarına neden olarak hücre zarı lipitlerine ve proteinlerine zarar verir (4, 28, 32, 36).

2.1.3. Doksorubisin ve İskelet Kası Atrofisi

DOX, çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan sitotoksik etkiye sahip bir ajandır (37). DOX oldukça etkili bir kemoterapötik olup kullanımı konjestif kalp yetmezliği, iskelet kası atrofisi, yorgunluk ve dispne gibi istenmeyen yan etkilerle sonuçlanmaktadır (38, 39). DOX tedavisi, kanser hastalarında yaşam kalitesini olumsuz etkileyen iskelet kası zayıflığı ve yorgunluğunun gelişmesine yol açar (5). Bu sitotoksik özelliği nedeniyle iskelet kası atrofisine yol açtığı çeşitli insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (40, 41). İskelet kası toksisitesindeki hücresel ve moleküler mekanizmalar, DOX kaynaklı oksidatif stres yoluyla proteolitik ve apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkili olarak kontraktıl ve mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olur (Şekil 2.2.) (6).



Şekil 2.2. Kemoterapinin etkilediği sinyal yolları (42). Kemoterapötikler, özellikle DOX, kas protein sentezi inhibisyonu, protein yıkımı ve mitokondri hasarına neden olmaktadır.

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1, IRS-1: İnsülin reseptörü substratı-1, PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinaz, mTOR: Memelilerde rapamisinini hedefi, AMPK: Adenozin monofosfat ile aktifleştirilen protein kinaz, GLUT-4: Glukoz taşıyıcı tip 4, FoxO1,3: *Forkhead box O1* ve *Forkhead box O3a*, MaFbx: *Muscle atrophy F-box*, MurF-1: *Muscle RING-finger protein-1*, BNIP3: BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa protein etkileşimli protein 3.

Meme kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılan ilaçların (DOX ve paklitaksel), C2C12 miyotüp hücre kültürlerinde miyozin ifadesinde azalmaya, mitokondri azalmasına ve ROT üretiminde artışa neden olarak iskelet kası atrofisine yol açtığı gösterilmiştir (38). Sarkoma tümörlerini tedavi etmek için hipertermik ekstremitte perfüzyonu şeklinde DOX tedavisinin de kas işlev bozukluğu ve atrofi ile sonuçlandığı raporlanmıştır (43).

Bir çalışmada, kalp ve iskelet kası kütlesi DOX tedavisinden sonraki 5 gün boyunca fonksiyonda zamana bağlı bir düşüş olduğu ve buna karşılık 5 günlük süre boyunca vasküler fonksiyonunda azaldığı rapor edilmiştir. DOX birikiminin kalp dokusunda en fazla olduğu, ancak tüm kas dokularının benzer derecede işlev bozukluğu gösterdiği sonucuna varılmıştır (44). Başka bir çalışmada, DOX uygulamasından sonra *tibialis anterior (TA)* ve *gastrocnemius* kaslarının doku ağırlıklarında önemli bir azalma olduğu ve kas atrofisi geliştiği gösterilmiştir (45). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kronik DOX tedavisine (2,5 mg/kg, haftada iki kez, toplam doz, 25 mg/kg) yanıt olarak vücut ağırlığında ve *gastrocnemius* kütlesinde de önemli bir azalma olduğu raporlanmıştır (7). DOX uygulamasında 10, 12,5 veya 15 mg/kg'lık enjeksiyonlar alan sıçanların *soleus* kasında maksimum kasılma kuvvetinde sırayla %45, %60 ve %74 azalma gösterilmiştir (46). Sıçanlarda DOX (24 mg/kg) ile tedaviye başladıktan 4 hafta sonra iskelet kası ve kalp kası kaybının hemen hemen aynı olduğu gösterilmiştir (8). Sakrifikasyondan 48 saat önce uygulanan DOX (20 mg/kg) enjeksiyonu, diyafram, *soleus* ve *plantaris* kaslarında lif çapında önemli bir düşüşle sonuçlanmıştır. Aynı çalışmada yine DOX ile tedavi, diyafram, *plantaris* ve *soleus* kaslarında tip I, tip IIa ve tip IIx/b'de kas lifi çapında önemli bir azalma göstermiştir (39).

Tek başına tümör hücrelerine veya DOX'a maruz kalma, *soleus* ağırlığında yaklaşık %13-16'lık bir azalmaya neden olmuştur. Kanser kemoterapisinin birleşik etkisi ile farelerin *soleus* ağırlığında ve enine kesit alanında benzer bir azalma ortaya

çıkıştır (47). Bir meta-analiz, DOX uygulamasının, kontrolleri ile karşılaştırıldığında kas lifi çapını %17 oranında önemli ölçüde azalttığı sonucuna varmıştır (42). Başka bir çalışmada, tek doz DOX (15 mg/kg) uygulaması ile *ekstansör digitorum longus* (EDL) kasının enine kesit alanında bir azalma meydana gelmiştir (17).

DOX uygulamasının vücut kompozisyonu, *soleus* kas kütlesi ve belirgin patolojik özellikler ile bağlantılı olduğu ve topoizomera II β (TOP2B) yukarı regülasyonunun DOX kaynaklı miyotoksisite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (48). DOX'un TOP2B ile paralel olarak DNA'ya etkisi, kardiyomiyositlerde DNA'nın hasar görmesine neden olur (49). DOX'un, farelerde ve C2C12 hücrelerinde çözünabilir guanilat siklaz (sGC) aktivitesini azalttığı ve sGC aktivitesi ile iskelet kası liflerinin enine kesit alanı arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. DOX tedavisi ayrıca protein sentezinde ve aktif ubikütin-proteazom yolağında hasara neden olmuştur (50). DOX ve hidrojen peroksit, *Kelch* benzeri ECH ile ilişkili protein 1/Nrf2 yolunun aracılık ettiği miyogenin protein miktarını azaltmıştır (51).

DOX'un farklılaşmış hücrelerde oksidatif stresi tetiklediği ve bu durumun da mitokondri belirteçleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. DOX'a maruz kaldıktan sonra farklılaşmış C2C12 hücrelerinde atrofi belirteci olan MAFbx'in ifadesinin arttığı ve DOX ile inkübasyonun (4 μ M) hücre sayısını azalttığı rapor edilmiştir (52). Başka bir çalışmada ise DOX'un farelerde kas fonksiyonunu önemli ölçüde azalttığı ve bu azalmanın kontrollerle karşılaştırıldığında NLR ailesi pirin alanı içeren 3 (NLRP3) ve *toll* benzeri reseptör 4 (TLR4)'deki artışla ilişkilendirildiği gözlenmiştir. Ayrıca DOX ile tedavi edilen hayvanlarda proinflamatuvar sitokinlerde (tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve *interlökin-6* (IL-6)) ve inflamatuvar M1 makrofajlarda önemli bir artışın olduğu saptanmıştır (53).

2.1.4. Doksorubisin ve Mitokondriyal Hasar

DOX tedavisinin mitokondri hasarına neden olduğu Tıp dünyasında bilinen bir gerçektir. Son araştırmalar, DOX kaynaklı mitokondriyal hasarın hücresel işlev bozukluğunu tetiklediğini göstermiştir (10). DOX uygulamasından sonra ROT üretiminin arttığı çeşitli çalışmalarda raporlanmıştır (Şekil 2.3.) (47, 54). *Cardiolipin*

mitokondri iç zarında bulunur ve işlevi bozulduğunda ROT üretiminde artış olur (55). DOX uygulaması *cardiolipinin* işlev bozukluğuna neden olarak ROT üretimi artışı ile sonuçlanır (56). İç mitokondriyal membrana lokalizasyon, kompleks I'in nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz (NADH) tarafından DOX'un indirgenmesine neden olur, bu da ROT üretimini ve mitokondriyal işlev bozukluğunu artıran süperoksit radikallerinin oluşumuyla sonuçlanır (39). Bu ROT üretimi iskelet kasında oksidatif hasara neden olur. İskelet kasındaki oksidatif hasar, temel proteolitik sistemlerin aktivasyonu yoluyla kas yıkımını uyarmak için bir tetikleyici görevi görür (57, 58).

ROT'ların artışı mitokondriyal yapıya ciddi şekilde zarar vererek, apoptoza ve kalp solunum kaslarında kasılmada azalmaya neden olarak kalp ve solunum fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Şekil 2.3.) (12, 13). ROT kaspaz-3 ve ubiküitin-proteazom yolağını içeren proteolitik sistemleri aktive ederek iskelet kasında protein yıkımını uyarır (54). DOX ile oluşturulan iskelet kası atrofisinde başka bir moleküler yol ise ubikütine bağımlı proteazom yoludur. Ek olarak DOX'nin neden olduğu protein yıkımında rol oynayan potansiyel bir mekanizma olarak otofaji de ileri sürülmüştür (15, 19). Min ve ark. 20 mg/kg'lık tek bir DOX enjeksiyonunun mitokondri solunum kapasitesinde azalmaya ve iskelet kaslarında mitokondriyal ayrılmada ve işlev bozukluğunda artışa neden olduğunu bildirmiştir (39). Aynı çalışmada, DOX uygulaması hem kalp hem de iskelet kaslarında (diyafram, *soleus* ve *plantaris* kasları) mitokondriyal ROT emisyonunda, 4-HNE ile modifiye edilmiş proteinlerde, kalpain aktivitesinde, kaspaz-3 aktivitesinde ve TUNEL-pozitif çekirdek sayısında önemli bir artışa neden olmuştur (39).

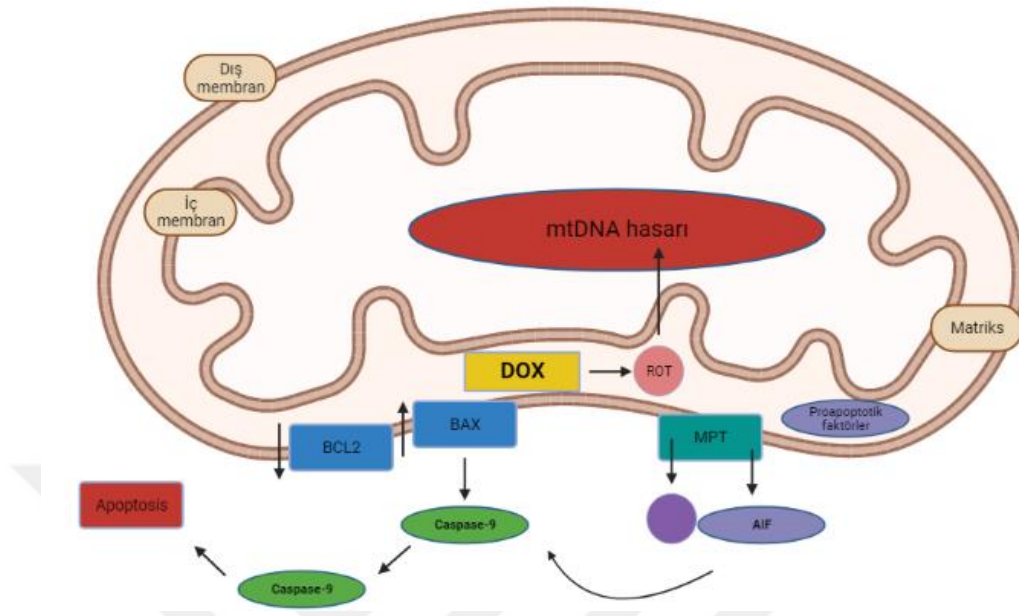
Tek doz DOX uygulaması (20 mg/kg), mitokondriyal kompleks I ve kompleks II'yi etkileyerek iskelet kasındaki mitokondriyal solunumu baskılar (14). Başka bir çalışmada ise yine tek doz DOX uygulaması mitokondriyal H₂O₂ üretme oranını ~%94 artırmış ve iskelet kasındaki miyofibriler proteinlerin oksidatif modifikasyonlarını artırmıştır (59). Yüksek hücresel oksidanlar, tüm kas işlevini etkileyebilen proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarına neden olabilir (60). DOX uygulaması, reaktif protein karbonil seviyelerinde de benzer bir artışa neden olmuştur (47).

15 mg/kg'lık bir dozda DOX enjeksiyonu, iskelet kaslarındaki TUNEL apoptotik indeksinin %583 ve Bax protein ifadesinin ise %111 oranında daha yüksek olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada Bcl-2 protein ifadesi ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iki kat ve hafif zincir 3 (LC3) II'nin -LC3 I'e oranının ise, DOX enjeksiyonundan 24 saat sonra %243 arttığı gösterilmiştir (15). Bununla birlikte DOX uygulaması, tip I spesifik *soleus* kasında otofaji belirteçlerinin ifadesini artırır (21). Bu süreç otofaji-ilişkili (Atg) proteinler tarafından düzenlenir. Otofagozom başlatma proteini *Beclin-1*, Atg proteinlerini membrana bağlayarak otofajide önemli bir rol oynar (61). Smuder ve ark. DOX ile tedavi edilen farelerin *soleus* kasında hem *Beclin-1* mRNA hem de protein seviyelerinin yükseldiğini rapor etmişlerdir (21).

Bir çalışmada, iki hafta boyunca her üç günde bir toplam dört DOX enjeksiyonu (6 mg/kg) alan farelerin vücut ağırlığında, *tibialis anterior* ve *gastrocnemius* kas kütlelerinde önemli bir azalma meydana gelmiş ve buna kas kaybına bağlı bir protein olan *regulated in DNA damage and development 1* (REDD1)'in mRNA ifadesinde 2 kat artış eşlik etmiştir (45). DOX'un iskelet kası üzerindeki zararlı etkisi, protein parçalanmasındaki artışlardan ziyade protein sentezindeki azalmalar yoluyla meydana gelmiştir (45).

REDD1, kas kütlesinin negatif düzenleyicisidir. Oksidatif stres ayrıca REDD1'in yukarı regülasyonu ile ilişkilidir (19). Başka bir çalışmada yine DOX uygulamasının iskelet kasında REDD1 mRNA ifadesinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (62).

PGC-1 α mRNA izoformlarının çoğu iskelet kasında DOX ile azalırken, kalpte artma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (8). PGC-1 α mitokondriyal biyogenez, anjiyogenez ve bir dereceye kadar kas hipertrofisini düzenler (16). PGC-1 α , AMPK α ile yakından ilişkili olduğu için, 15 mg/kg dozunda tek doz DOX uygulaması L6 miyositlerde 48 saat sonra AMPK α 'nın fosforilasyonunda azalma göstermiştir (17).



Şekil 2.3. Dokсорubisin ve mitokondri hasar yolları (63).

DOX: Dokсорubisin, ROS: Reaktif oksijen türleri, MPT: *Mitochondrial permeability transition*, AIF: *Apoptosis inducible factor*,

2.2. İskelet Kası Atrofisi

İskelet kası, toplam vücut kütlelerinin yaklaşık %40'ını oluşturan ve genel vücut protein depolarının %50-75'ini içeren vücuttaki en büyük, en dinamik ve plastik dokulardan biridir (64). İskelet kas kütlelerinin ve işlevinin sürdürülmesi, farklı patolojik koşullarda bozulabilen bir anabolizma ve katabolizma dengesi ile sağlanır (65). Kontraktil protein miyozin ağır zinciri (MHC) 1, insan kas lifi tiplerinde ortak bir tanımlayıcı yapı olarak tanımlanabilir. MHC tip I, IIa ve IIx formlarında bulunur ve kas lifleri bu izoformlardan yalnızca birini veya birkaçını içerebilir (66). Genel olarak, MHC I'in yavaş kasıldığı, MHC IIa ve MHC IIx liflerinin ise genellikle daha hızlı ve daha güçlü olduğu gösterilmiştir (67). MHC II lifleri, MHC I liflerine kıyasla daha yüksek bir maksimum Ca^{2+} aktivasyonu gösterirken, Ca^{2+} duyarlılığı genellikle MHC I liflerinde daha yüksektir (68).

İskelet kası protein döngüsü, protein sentezini/yıkımını dengeleyen, doku işlevini ve kütlelerini devam ettiren metabolik bir süreçtir (69). İskelet kası atrofisi, protein içeriğinde, lif çapında, kuvvet üretiminde ve yorulmaya dirençte azalma ile

karakterizedir. İskelet kası atrofisi, artan miyofibriler protein parçalanması ve azalan protein sentezinin bir sonucu olarak iskelet kası kütlesinin kaybıdır.

2.2.1. Kullanılmama ile İndüklenen İskelet Kası Atrofisi

İskelet kasları sadece hareket için önemli değildir, aynı zamanda vücudun en büyük metabolik olarak aktif dokusunu, glikoz metabolizmasını ve patolojik durumlarda da diğer organlar için yakıt deposunu düzenler (70).

İskelet kası atrofisi, hareketsizlik/kullanılmama gibi katabolik hastalıklar nedeniyle net protein, organel ve sitoplazma kaybından kaynaklanır (71). İskelet kası kütlesi ile fiziksel aktivite düzeyi arasındaki ilişki karmaşıktır. Hareketsizlik sırasında vücut kompozisyonu çeşitli şekillerde değişir ve yağ kütlesi artar, kas kütlesi azalır (72, 73). İskelet kası atrofisi, denervasyon, uzuv hareketsizliği, uzun süreli yatak istirahati, sedanter yaşam tarzı, uzay uçuşu, mikro yerçekimi ve fiziksel hareketsizlik gibi durumlardan kaynaklanır (kullanılmama olarak da bilinir) (74-77).

Kas kütlesi açısından, 42 günlük diz ekstansörlerinde unilateral ekstremitte süspansiyonunun her günü için kas boyutunda gözlenen azalma oranının ~%0,40 ve plantar fleksörler için ~%0,36 olduğu bir çalışmada gösterilmiştir (78). İki haftalık ekstremitte immobilizasyonu ile *kuadriseps* kası hacminde %9, kas enine kesit alanında %5-8 ve kas gücünde %23 azalma meydana gelmiştir (79). Suetta ve ark. 4 gün sonra kas lifi alanında ~%10, güçte ~%13 azalma ve 14 günlük unilateral ekstremitte süspansiyonundan sonra kas lifi alanında ve güçte ~%20 azalma olduğunu rapor etmişlerdir (80). Diğer bir çalışmada ise, kullanılmamada erken dönemde kas kuvveti ve kütlesinde kayıplar olduğu gösterilmiş olup 5 günlük alçı immobilizasyonu, *kuadriseps* enine kesit alanında ~%3,5 ve kuvvette ~%9 azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir (81).

Kullanılmama iskelet kası atrofisi, insan yatak istirahati çalışmalarında ve hayvan arka ekstremitte immobilizasyonu modellerinde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (82, 83). Uzun süreli yatak istirahati, kas kuvvetinin azalmasına, miyoglobinin aşağı regülasyonuna, oksidatif fosforilasyon kompleks aktivitesinin ve sitrat sentezinin azalmasına neden olmuştur. Bu bulgular, kullanılmama iskelet kası

atrofisi ile mitokondriyal işlev bozukluğu arasındaki ilişki ile ilgilidir (82). Alkner ve ark. 90 günlük yatak istirahatinin 29. gününden sonra *kuadriseps* ve *triceps surae* kas kütlelerinde sırasıyla ~%10 ve ~%16 azalmaya yol açtığını, haftalık kayıp oranlarının son 2 ayda yavaşlayarak ilk ayda gözlemlenenin yarısına indiğini bildirmiştir (84).

Kısa uzay uçuşlarından sonra bile iskelet kası atrofisi belirgin bir bulgudur. Bu atrofi hem makroskobik olarak tüm kastaki boyut veya hacim azalması açısından hem de mikroskobik olarak kas lifi boyutu açısından görülebilir (85). 17 günlük uzay mikro yerçekimi, *kuadriseps*, *soleus*, *gastroknemius* ve intrinsik sırt kaslarının boyutunda %4-10'luk bir kayıpla sonuçlanmıştır (86). Uzay uçuşu sırasında, *soleus* ve *gastroknemiusta* tip I ve II kas lifleri en yüksek düzeyde iskelet kası atrofisine maruz kalan lifler olduğu gösterilmiştir (87).

Uzun süreli iskelet kası hareketsizliği, NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz ve mitokondri dahil olmak üzere hücrede birçok yerde süperoksit üretiminin artmasına neden olur (88). Lawler ve ark. immobilizasyonun ROT seviyelerini artırdığını ve antioksidan üretimini azalttığını bildirmiştir (89). Bir haftalık arka bacak denervasyonu, otofajide önemli rol oynayan parkin (E3 ubiküitin ligaz) ifadesi ve ROT'u artırmıştır (90). Uzun süreli kullanılmama dönemlerine maruz kalan kastaki mitokondri, önemli ölçüde daha fazla ROT salgılar (91).

2.2.2. Kaşeksi ile İndüklenen İskelet Kası Atrofisi

Kaşeksi, ilerleyici vücut ağırlığı kaybı ve iskelet kası kütlelerinde azalma ile karakterize multifaktöriyel bir sendromdur (92). Kanser kaynaklı kas kaşeksisinin genel etkisi çok büyüktür, hemen hemen her kanser türünde görülür ve tüm kanser hastalarının tahmini %50'sini etkiler (93). Pankreas veya mide kanseri olan hastalar en yüksek kilo verme sıklığına sahipken, *non-Hodgkin* lenfoma, meme kanseri, akut lenfositik olmayan lösemi ve sarkomlu hastalar en düşük kilo verme sıklığına sahiptir (94).

Kas kaşeksis, bağışıklık ve nöroendokrin işlevlerin yanı sıra tüm vücut metabolizmasındaki yaygın değişikliklerden kaynaklanır ve bu sıklıkla iskelet kası

içinde anormal sinyalleşme ile sonuçlanarak kas proteinlerinin parçalanmasına ve kas atrofisine neden olur (95).

TNF- α , akut faz reaksiyonunda ve vücut homeostazının korunmasında apoptozu düzenlemede rol oynar. Ancak kanserde kas kaşeksisinin yanı sıra tümör büyümesinde ve metastazında önemli bir rol üstlenir (96). İskelet kasında TNF- α sinyali, ubikütleşme yoluyla artan proteolize yol açar (97). TNF- α , kas atrofisini indüklemek için iskelet kasındaki MAFbx gen ifadesi seviyelerini artırarak *p38 mitojen aktive protein kinaz* (MAPK) sinyal yolağı ile birlikte hareket edebilir (98). Nükleer faktör kappa B (NF-kB) sinyali ise, miyosit rejenerasyonunu engelleyen ve *MyoD/miyogenin* transkripsiyonel aktivitesini baskılayarak kas atrofisine katkıda bulunan bir transkripsiyon faktörü olan *protein-paired box 7* (PAX7)'nin aşırı ifadesine neden olur (99). Ayrıca IL-6, iskelet kasında protein sentezini baskılayan ve artan enerji harcamasını ve azalan yağ kütlesini destekleyen kas kaşeksisinin birincil aracısı olarak uzun zamandır bilinmektedir (100).

Miyostatin, normalde kas büyümesinin otokrin negatif düzenleyicisi olarak işlev gören bir proteindir (101). Tümör hücreleri, yüksek seviyelerde sistemik *aktivin-A* salgılar ve bu lokal miyostatin gibi protein yıkımını artırarak ve protein sentezini inhibe ederek kas atrofisine neden olur (102).

Kanser hücreleri tarafından salgılanan proteolizi indükleyen faktör, kaspazları aktive ederek apoptozu indükler, iskelet kasında protein sentezini inhibe eder ve proteolizi hızlandırır (103). Kanser hücreleri tarafından glikoz tüketimi, karaciğerdeki glikojeni tüketir, glikojenoliz daha da artırır ve iskelet kasının bozulmasını destekler (104). Bir çalışmada, *gastroknemius* kasındaki MAFbx ve MuRF1 mRNA ifadesi seviyeleri, tümöre sahip farelerde önemli artmış ve bu da iskelet kası kaybına yol açtığı rapor edilmiştir (105). Deneysel çalışmalar ayrıca *Twist1* transkripsiyon faktörünün kanser kaynaklı kas atrofisindeki işlevini de araştırmıştır. Örneğin, *Twist1* ifadesinin MuRF1 ve MAFbx ifade düzeylerini artırdığı ve kas protein sentezinin bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir (106).

Yapılan çalışmalar, otofajinin kas kaybı sırasında transkripsiyonel olarak yukarı regüle edildiğini göstermiş ve kas kütlesinin düzenlenmesinde otofaji-lizozom

sisteminin önemli olduğuna dikkat çekmiştir (107). Bir çalışmada otofajideki bir artışın kas mitokondri işlevinde açıkça bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (108). Mitokondri dejenerasyonu, tümör taşıyan farelerde kanser kaşeksisinin gelişiminde kas atrofisinden önce gelir ve kaşeksi ile ilişkili kas kaybından önceki mitokondriyal hasar için öncü bilgiler sağlar (109).

2.3. Egzersiz ve Kas Atrofisi

İskelet kası sadece fiziksel egzersizin temeli değil aynı zamanda insan vücudundaki ana glikoz metabolizması organıdır ve de patolojik enerji eksikliği durumunda vücudun enerji depolama dokusudur (73). Uygun fiziksel egzersizin insan vücut sağlığına faydalı olduğu iyi bilinmektedir (110). Fiziksel egzersiz aynı zamanda kardiyopulmoner işlevleri iyileştirebilir, kardiyovasküler hastalık riskini azaltabilir ve obezite/diyabeti önleyebilir (111).

Egzersizin, moleküler fizyoloji, organel işlevi, hücre sinyal yolları ve epigenetik düzenlemedeki değişiklikler yoluyla kas kaybını önlemede veya yavaşlatmada etkinliği gösterilmiştir (Şekil 2.4) (112). Fiziksel egzersiz sırasında, mitokondriyal biyogenezi düzenleyen faktörler yükselir ve bu da mitokondriyal protein sentezini doğrudan artırır (113). Yaşlanan iskelet kasında, mitokondriler daha küçük, metabolizması ve biyosentezi yavaştır, bu da kas kütlesi ve kas performans parametrelerinde hızlı bir düşüşe neden olur (114).

Hem dayanıklılık egzersizi hem de direnç egzersizi insan sağlığı için iyidir. Dayanıklılık egzersizi kardiyovasküler hastalıkları önlemede daha etkili kabul edilirken, direnç egzersizi yaşa bağlı kas atrofisini engelleyerek kas kütlesini korumada daha etkilidir (115).

Bir çalışmada, insanlarda 14 günlük tek bacak immobilizasyonu sırasındaki direnç egzersizinin, *kuadriseps* kas kütlesini korumak için yeterli olduğu gösterilmiştir (116). Direnç egzersizi, plazma IL-6 artışı ve kas oksidatif stresinin aracılık ettiği iskelet kasında sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) aşırı aktivasyonunu önlemiştir. Direnç egzersizi, kas atrofisini önlemenin ötesinde, sarkopeninin belirtileri olan güç kaybını ve bozulmuş lokomotor kapasiteyi de düzeltmiştir (117). 14 gün

boyunca sürekli yatak istirahati sırasında istemli yorgunluğa karşı direnç egzersizi, kas protein sentezindeki azalmaları önlemiştir (118).

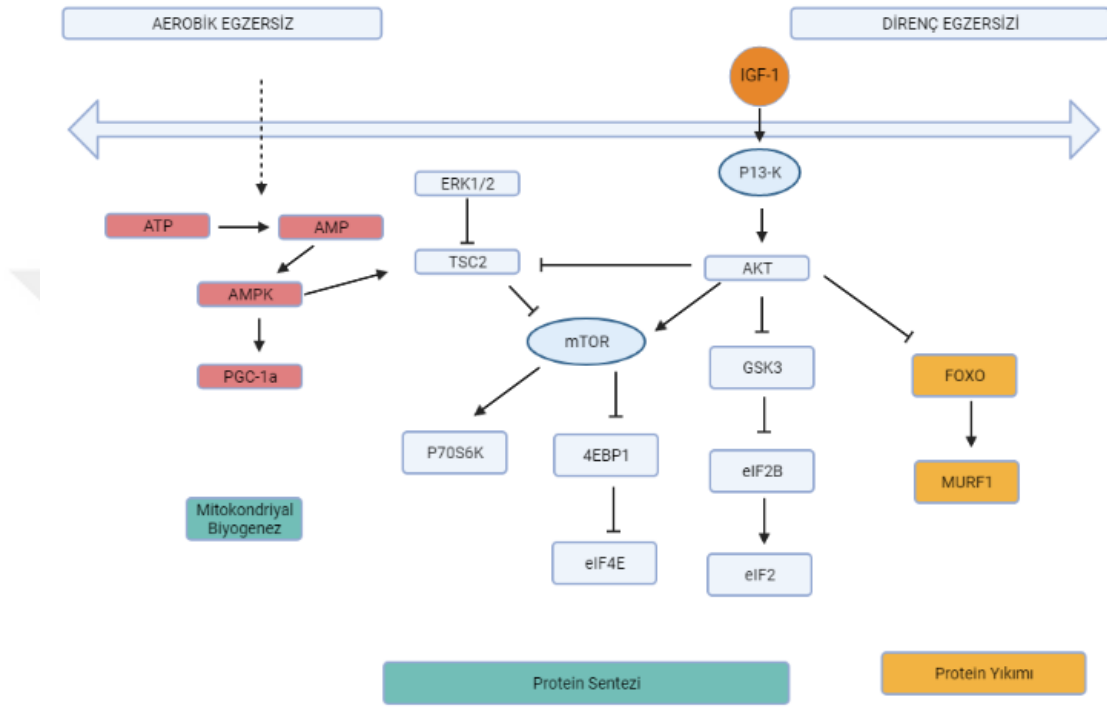
Direnç egzersizi aynı zamanda tümör büyümesine, kansere bağlı kas erimesine karşı korumaya katkıda bulunan mekanizmalara ve inflamatuvar interlökinler gibi salınan kas proteolitik faktörlerine karşı sistemik bir tepki verebilir (119). Sıçanlarda direnç egzersizi, p70S6K fosforilasyonunda bir artışa neden olabilir ve p70S6K fosforilasyonundaki artışın büyüklüğü, hipertrofinin indüklenmesi ile yüksek oranda ilişkilidir (120).

Dayanıklılık ve direnç egzersizinin, son egzersiz seansından sonra sırasıyla 2 ve 4 güne kadar kas protein sentezini artırdığı gösterilmiştir (121, 122). Fiziksel egzersiz, kas büyümesi ile ilişkilidir ve ubikütin proteozom/otofaji sinyalinin engellenmesine neden olabilir (123). Direnç egzersizinin rapamisine duyarlı *memelilerde rapamisinin hedefi* (mTOR/mTORC1)'e bağlı sinyal yollarını etkileyerek, protein sentezinde bir artışı indüklediği gösterilmiştir (124).

Son çalışmalar, 85 gün yatak istirahati sırasında eşzamanlı egzersizin, genç erkeklerin *vastus lateralis* kasındaki mitokondriyal işlev, oksidatif metabolizma ve sirkadiyen ritim ile ilgili transkriptlerin ifadesini normalleştirdiğini göstermiştir (125). Egzersiz moduna özgü tepkiler AMPK aktivasyonu açısından gözlemlenmiştir (126). AMPK, insanlarda direnç egzersizinden sonra da aktive olur (127). Kang ve ark., anaerobik sprint egzersizine tabi tutulan dişi farelerde PGC-1 α ifadesinin kontrol grubuna kıyasla 5,6 kat arttığını buldu (128). Dayanıklılık egzersizi, hızlı kasılan iskelet kasındaki proteini artırırken plazma serbest amino asit seviyelerini düşürür ve kastaki MHCII ifadesini artırır ve mTOR/p70S6K sinyal yolağı bu sürece dahil olabilir (129). Akut bir egzersiz veya uzun süreli dayanıklılık egzersizi, iskelet kasında PGC-1 α 'nın deasetilasyonunu uyarabilir. Egzersiz, enerji metabolizması ile ilişkili sinyal yolağını aktive ederek PGC-1 α 'nın ifadesini artırarak yavaş kas liflerinde daha yüksek ifade edilmektedir (130).

İskelet kasında, mitokondri içeriği dinamik olarak dengelenir ve kas hücreleri, doku metabolizmasının gerektirdiği enerjiye göre mitokondri sayısını düzenleyebilirken, uzun süreli hareketsizlik, kronik hastalık ve yaşlanma mitokondri

sayısını ve işlevini azaltabilir (131, 132). Çok sayıda araştırma, dayanıklılık egzersizinin iskelet kaslarında hem süperoksit dismutaz (SOD)1 hem de SOD2 düzeyini artırdığını göstermektedir (12). Bu da antioksidan enzimlerin egzersizle artarak koruyucu ve tedavi edici etkisini açıklamaktadır.



Şekil 2.4. Egzersizin kas atrofisi üzerindeki etkileri (133).

ATP: Adenozin trifosfat, AMP: Adenozin monofosfat, AMPK: AMP activated protein kinase, PGC-1α: *Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatör-1α*, ERK 1/2: *Extracellular signal-regulated kinase*, TSC 2: *Tübero Skleroz Kompleksi 2*, mTOR: *Memelilerde rapamisinin hedefi*, IGF-1: *İnsülin benzeri büyüme faktörü-1*, PI3K: *Fosfatidil inositol 3 kinaz*, AKT: *Protein kinaz b*, GSK3: *Glikojen sentaz kinaz 3*, FOXO: *Forkhead box*, MURF1: *Muscle RING-finger protein-1*

2.3.1. Doksorubisin ile İndüklenen Kas Atrofisinde Egzersizin Etkileri

1979'da Combs ve ark., egzersizin DOX'un toksisitesine karşı terapötik etkiler ortaya çıkardığına dair ilk kanıtı sağladı (Şekil 2.5) (134).

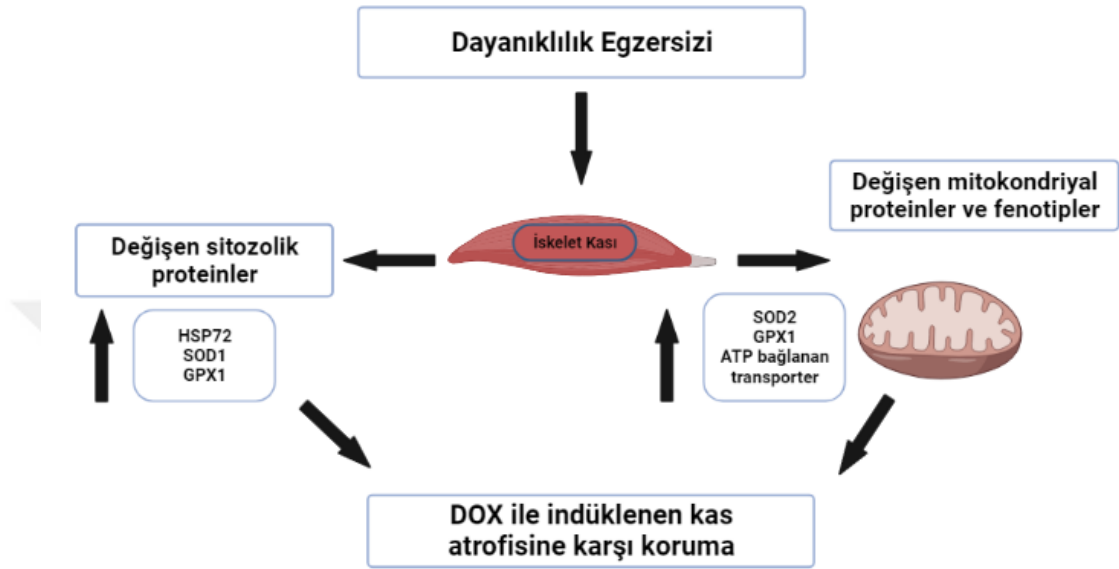
DOX tedavisi öncesi yapılan dayanıklılık egzersizinin oksidatif stresi ve proteolitik sinyal yollarının aktivasyonunu önleyerek DOX kaynaklı iskelet kası atrofisine karşı koruduğu gösterilmiştir (135). DOX ile indüklenen iskelet kası atrofisi, farklı lif tiplerine sahip (oksidatif yapıya sahip tip I veya glikolitik yapıya sahip tip II

kaslar) iskelet kaslarından bağımsız olarak ortaya çıkabilir. Egzersizin hızlı kasılan glikolitik (*ekstansör digitorum longus*) kaslara kıyasla yavaş kasılan oksidatif (*soleus*) ve karma (diyafram) kaslarını daha iyi koruduğu görülmektedir (18). Başka bir çalışma, kronik DOX dozu ile birlikte yapılan aralıklı antrenmanın, *soleus* kasının atrofisini önlemek için de yeterli olduğunu göstermiştir (136). Bu nedenle egzersiz, DOX tedavisinin öncesinde veya başlangıcında başlatıldığında iskelet kası atrofisine ve zayıflığına karşı koruma sağlayabilir. Egzersiz, oksidan tamponlama kapasitesini artırarak, endojen antioksidan enzimlerin aktivitesinde artışı indükleyerek DOX toksisitesini önleyebilir. Yapılan bir çalışmada, DOX ile birlikte yüzme egzersizi yapan hayvanlarda kalp ve karaciğerdeki antioksidan enzim aktivitesi artmıştır (137). Mitokondriyal biyogenezin ana düzenleyicisi olarak bilinen PGC1 α ifadesinin, atrofik koşullar altında *gastroknemius* kasında önemli ölçüde azaldığı ve genetik manipülasyon yolu ile indüklenen PGC1 α 'nın ifadesinin artışı, *Forkhead box o3* (FoxO3)'ü baskılayarak *tibialis anterior* kasındaki tip II lif atrofisini azalttığı bulunmuştur (138).

Mekanik ventilasyondan önce gerçekleştirilen dayanıklılık egzersizi, diyafram liflerini ventilatörün neden olduğu mitokondriyal işlev bozukluğundan, oksidatif stresten, proteolitik aktivasyonundan ve lif atrofisinden korumuştur (139).

Kas-iskelet fonksiyonundaki değişiklikler egzersiz kapasitesini etkileyebilir ve DOX'a maruz kalan kadın hastalar, erkeklere kıyasla artmış egzersiz intoleransı ve bozulmuş aerobik kapasite sergilemiştir (140). DOX tedavisi ile birlikte yapılan aerobik egzersiz, kas kütlesini, lif enine kesit alanını, maksimum aerobik kapasiteyi artırarak kas yorgunluğunu azaltmıştır. Bu DOX'un AMPK aktivasyonu aracılığıyla kas performansı ve biyoenerjetik üzerindeki olumsuz etkilerini baskıladığını göstermiştir (7). DOX tedavisi ile birlikte egzersiz, sıçanların kalbinde ve *soleus* kasında mitokondriyal oksidatif solunum ve redoks dengesini korumuş ve erkek sıçanlarda MuRF1 sinyalini azaltmıştır (20). DOX tedavisinde egzersiz *soleus* ve diyaframda miyojenik düzenleyici faktörü (MRF) yanıtını artırmış, bu da egzersizin rejeneratif sinyali artırabileceğini düşündürmüştür (141). Dayanıklılık egzersizi, iskelet kasının antioksidan kapasitesini artırır, kası DOX kaynaklı oksidatif stresten ve otofaji

genlerinin ifade edilmesinden korur (21). Egzersiz, hem miyofibriler proteinler içindeki karbonil seviyelerinde hem de 4-HNE'nin kas proteinlerine konjugasyonunda azalma ile iskelet kası proteinlerinin DOX kaynaklı oksidatif modifikasyonuna karşı korur (19).



Şekil 2.5. Egzersizin doksorubisin ile indüklenen kas atrofisi üzerindeki etkileri (142).

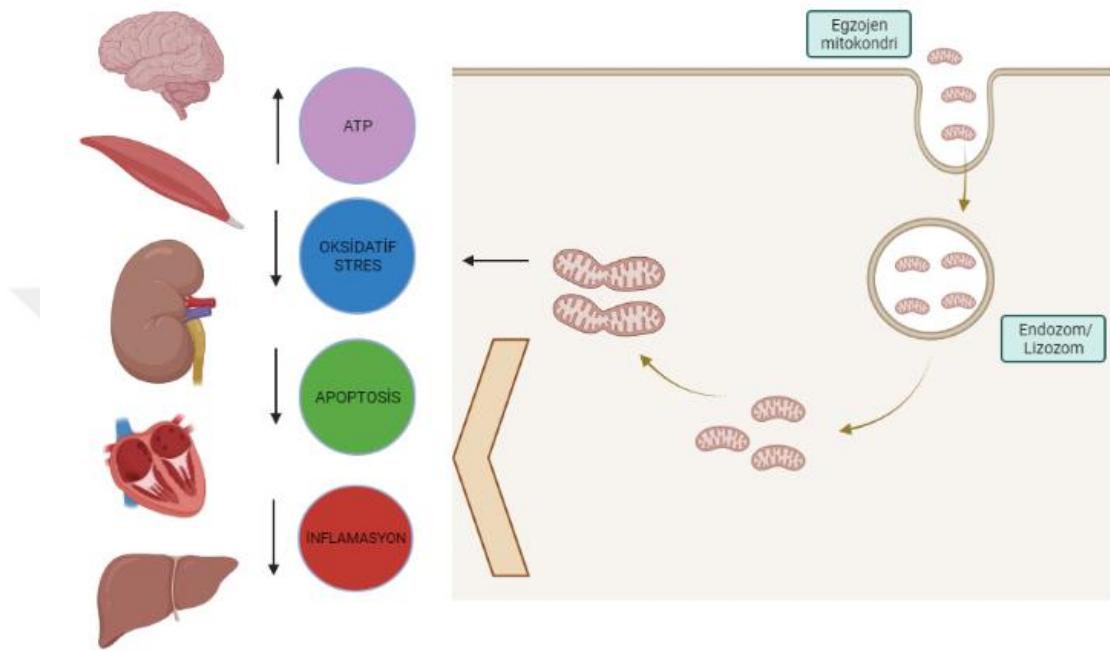
HSP72: *Heat shock protein 72*, SOD: Süperoksit dismutaz, GPX: Glutasyon peroksidaz

2.4. Mitokondri Transplantasyonu/Transferi

Mitokondri transplantasyonu, mitokondri işlev bozukluğuna bağlı hastalıkların tedavisi için son yıllarda umut verici bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemin, insan klinik deneylerinde kardiyak iskemi-reperfüzyon tedavisi için yararlı olduğu bildirilmiştir ve ayrıca mitokondriyal işlev bozukluğuna bağlı kalp, böbrek, karaciğer, akciğerler, yaşlanma ve beyin hastalıklarını tedavi edici etkisi prelinik çalışmalarda gösterilmiştir.

Soleus, *pektoralis majör*, *rektus abdominis*, *gastroknemius* ve kök hücreler gibi kaynaklardan izole edilen mitokondrilerin transplantasyonu, çeşitli modellerde başarılı olmuştur. Çok sayıda çalışmada, ekzojen mitokondrilerin direkt enjeksiyon, sistemik enjeksiyon ve intranazal olarak *in vivo* ve ko-inkübasyon gibi *in vitro*

yöntemlerle hedef doku ya da hücrelere biyodağılımı gösterilmiştir (143). Mitokondri transplantasyonu *in vitro* deneylere ek olarak, doğrudan canlı organizmalara enjekte edilebilir (144). Enjeksiyon için kullanılan mitokondri otolog, allojenik ve hatta ksenojenik olabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Mitokondriyal transplantasyon/transfer mekanizmaları (145).

ATP: Adenozin trifosfat.

2.4.1. Hücreler arası Doğal Mitokondri Transferi

Mitokondri, hücre sitoplazmasında bulunur ve hücrenin enerjisinin çoğunu adenozin trifosfat (ATP) formunda ürettikleri için genellikle hücrenin güç merkezi olarak adlandırılır. Mitokondri çapları 0,5 ile 1 μm ve uzunlukları 0,5 ile 10 μm arasında değişir ve dokular arasında da çeşitlilik gösterir (146). Mitokondriyal morfolojiler, farklı hücre tipleri arasında büyük farklılıklar gösterir. Örneğin, fibroblastlardaki mitokondriler genellikle uzun filament şeklinde (1 ile 10 μm uzunluğunda ve ~ 700 nm çapında) iken hepatositlerdeki mitokondriler daha düzgün küresel veya ovaldir (147).

Mitokondriler, morfolojilerini dinamik olarak yeniden düzenlemenin yanı sıra hücre içinde hareket etme yeteneğine sahip ve devam eden füzyon ve fizyon

mekanizması ile hücre içinde varlıklarını sürdürürler (148). Uzun bir süre mitokondrinin sitoplazma içinde sınırlı olduğu düşünülmüştür. Ancak mitokondriler hücre içinde yeniden programlama durumuna maruz kalırlar (149). Ortaya çıkan kanıtlar, mitokondrinin dinamik doğasının hücre sınırlarının ötesine geçebileceğini, memeli hücreleri arasında yer değiştirebileceğini ve mitokondri/mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın başka bir hücreye nakledilebileceğini ortaya koymaktadır (150).

Mitokondrinin hücreler arası transferi için en iyi bilinen moleküler mekanizmalar, tünel oluşturan nanotüpler (TNT'ler), hücre dışı veziküller (EV'ler), yarık bağlantı kanalları (GJC'ler) ve ekstrüzyondur. TNT'ler, organel veya zar veziküllerinin ve küçük sitoplazmik/zar moleküllerinin değişimini sağlarlar (Şekil 2.7) (150).

Mitokondrilerin TNT'ler yoluyla transferi, genellikle TNT oluşumunu başlatan hücreden reseptör hücreye tek yönlüdür (151). Çapları 50 ila 200 nm arasında değişir ve uzunlukları 150 µm'ye ulaşabilir (152). 2004 yılında Rustom ve ark. organellerin memeli hücreleri arasındaki hareketini TNT'ler aracılığıyla ilk kez saptamış ve buna ek olarak Spees ve ark. 2006 yılında normal mitokondrinin mezenkimal kök hücreler (MKH'ler)'den disfonksiyonel mitokondriye sahip memeli hücrelerine transferini göstermiştir (153, 154).

Oksidatif stres altında, hücre içi p53 ifadesi yukarı doğru düzenlenir ve AKT-PI3K-mTOR sinyal yolu aktive edilir, bu da stresli hücrelerden stresli olmayan hücrelere doğru TNT'lerin oluşumuna yol açar ve dört organelin (endoplazmik retikulum, Golgi, endozom ve mitokondri) hücreler arası taşınmasına yol açar (155). Hücrede oluşan herhangi bir stres TNT oluşumunu indükleyebilir ve stresli hücrelerde, p53, S100A4'ü parçalamak için kaspaz-3'ü aktive ederek, TNT'yi başlatır (156). MKH'in, mitokondrilerini TNT'ler yoluyla daha önce hücrelerin glikoz-oksijen yoksunluğu altında kültürlendiği bir *in vitro* iskemi-reperfüzyon modeline tabi tutulan kardiyomiyositlere aktararak hücre hasarını düzelttiği gösterilmiştir (157). Ayrıca, MKH'lerden akciğer epitelyumuna mitokondriyal transferinin sigara dumanının neden olduğu akciğer hasarını azalttığı rapor edilmiştir (158). Pnömoni modeli uygulanan bir çalışmada, TNT'lerin ve mikrovezikül sekresyonu yoluyla MKH'lerin ve

immün hücreleri arasındaki mitokondriyal transferin, alveoler makrofajların bakterileri yok etme kapasitesini artırdığı bulunmuştur (159).

Kanser hücreleri ve stromal hücreler TNT'ler aracılığıyla iletişim kurmaktadır ve endotelden kanser hücrelerine TNT'ler yoluyla gerçekleşen mitokondri transferinin, DOX'a karşı kemoterapi direncini artırdığı gösterilmiştir (160). *Multiple* miyelomda, MKH'ler mitokondriyi TNT'ler yoluyla miyelom hücrelerine iletir ve çoğalmalarını destekler (161).

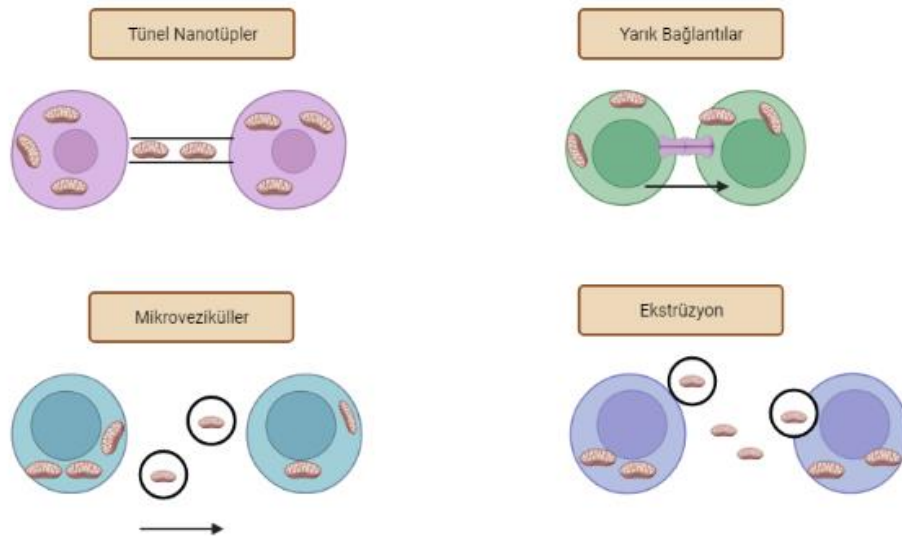
EV'ler, bir dizi fizyolojik ve patolojik süreçte hücreler arası iletişimi sağlamaktadır (162). EV'ler çaplarına ve biyogenezlerine göre üç genel sınıfta toplanırlar: (1) endozomal zarın içe doğru tomurcuklanması yoluyla endositik kökenli olan eksozomlar (30-150 nm); (2) plazma zarının dışa doğru tomurcuklanmasıyla oluşan mikro-parçacıklar (150-1000 nm); ve (3) apoptotik hücreler tarafından salınan apoptotik cisimler ($> 1 \mu\text{m}$) (163). Ayrıca, hücrelerin mitokondri içeren hücre dışı EV'leri serbest bırakabildiği ve alıcı hücrelerin bir EV-hücresi füzyon olayı yoluyla mitokondri edindiği bildirilmektedir (150). MKH'lerde ve astrositlerde gözlemlendiği gibi, daha büyük EV'ler tüm mitokondriyal parçacıkları ve mtDNA'yı içerebilir (164). Hayakawa ve ark. astrositlerin mitokondriyal parçacıkları açığa çıkardığını ve daha sonra nöronal sağ kalımı ve dendrit gelişimini desteklediğini bulmuşlardır (165). Hough ve ark. alerjik hava yolu hastalığı modelinde miyeloid kaynaklı düzenleyici hücrelerin, mitokondriyi T hücrelerine aktaran mikroveziküller salgıladığını göstermiştir (166).

GJC'ler, yarı kanallarının kenetlenmesiyle oluşturulan iki bitişik hücre arasındaki direkt materyal değişim kanallarıdır (167). Mitokondrideki Cx43 yarı kanalları, mitokondriyal kalsiyum homeostazının korunmasını sağlar (168). Cx43 ayrıca mitokondrinin hücreler arası transferine de katılır. Islam ve ark, alveoler hücrelere yalnızca Cx43 ifade eden kemik iliği MKH'ni vermiş ve bu kök hücrelerin yalnızca alveolar hücrelerde Cx43'ün yüksek ifade bölgelerine bağlandığını rapor etmişlerdir (169). Li ve ark, yarı bağlantıları yoluyla MKH'den motor nöronlara mitokondri transferini gözlemlemişlerdir (170). Nöronal aksonlar içinde çift yönlü

mitokondri transferi nöronların farklı bölgelerindeki enerji ihtiyaçlarını karşılamak için gerekli olan belirgin bir hücre içi aktivitedir (171).

Ekstrüzyon belli koşullar altında mitokondri veya mitokondriyal içeriğin hücrelerden salınmasını gerçekleştirir. TNFa kaynaklı sırasında hücre ölümü sırasında sitoplazmik vakuoller, mitokondriyi çevreler, plazma zarı ile birleşir ve hücre dışı ortama mitokondriyi serbest bırakır (172).

Patolojik koşullar altında, hücreler arası mitokondriyal transfer, yalnızca merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve solunum sisteminde doku hasarını düzeltmekle kalmaz, aynı zamanda hücresel aktiviteye de katkıda bulunur ve bu nedenle kanser tedavisi direnci ve inflamasyon regülasyonu üzerine bir etkiye sahiptir (173).



Şekil 2.7. Hücreler arası doğal mitokondri transferi mekanizmaları (143).

2.4.2. Yapay Mitokondri Transferi/Transplantasyonu

i. *In vitro* Mitokondri Transferi/Transplantasyonu

Mitokondri transplantasyonu, mitokondriyal işlevi düzenlemek için sağlıklı ekzojen mitokondriyi hasarlı hücrelere veya dokulara transfer etmeye yarayan son yıllarda sıkça kullanılmaya başlayan bir tekniktir (22).

Hücreler arasındaki mitokondri transferi, *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir (174). Mitokondrilerin nanotüpler veya mikroveziküller yoluyla hücreler arasında transferi, alıcı hücreleri hasarlardan korur (175). *In vitro* mitokondri transferi/transplantasyonu için farklı yöntemler kullanılmakta ve her geçen gün yeni yöntemler araştırmacılar tarafından geliştirilmektedir.

Günümüzde kullanılan yöntemler: (a) Ko-inkübasyon, (b) mikroyenjeksiyon, (c) *mitoPunch*, (d) fototermal *nanoblade*, (e) *mitoception*, (f) manyetik mitotransfer (*magnetomitotransfer*) ve (g) *penetrating peptide* (Pep-1)'dir.

In vitro ko-inkübasyon yönteminde, Clark ve Shay ilk olarak mitokondri transplantasyonu yöntemini, belirli antibiyotikler kullanılarak hasar oluşturulan hücrelere, kloramfenikole dirençli hücrelerden izole ettikleri mitokondrileri transfer ederek göstermişlerdir. Transfer edilen mitokondrilerin alıcı hücrelerde mitokondrilerin ilgili mtDNA'ya sahip olması ile antibiyotik direnci geliştirdiği ve hücre canlılığını artırdığı tespit edilmiştir. Bu makalenin diğer önemli bir gözlemi, mitokondri transferinin fare hücrelerinde ko-inkübasyon yoluyla başarısız olması ve bu nedenle mitokondri transferinin hücre türleri arasında değişiklik gösterebileceğini düşündürmesidir. Fakat Clark ve Shay'in mitokondriyal transfer mekanizması bu alanda daha fazla ilerlemenin ve daha fazla soruların ortaya çıkmasına yol açmıştır (176). Elliot ve ark. meme epitel hücrelerinden izole edilen mitokondriler ile kanser hücrelerini (MCF7, MDA-MB-231 ve ADR-Res) ko-inkübasyona maruz bırakmışlar ve mitokondrilerin kanser hücrelerine girebildiğini ama normal epitel hücrelerine giremediğini tespit etmişlerdir (177).

King ve Attardi daha sonra invazif aletler kullanarak ilk mikroyenjeksiyon mitokondri transplantasyonu tekniğini geliştirdiler. Kloramfenikole dirençli

mitokondriyi 1 mikronluk bir iğne kullanarak 143BTK ve HT1080-6TG insan hücrelerine mikroenjeksiyon yoluyla aktarmışlardır (178). Bununla birlikte, başka bir çalışmada potansiyel olarak aktarılan sınırlı sayıda mitokondri nedeniyle bu mitokondriler dokularda saptanamamıştır (179).

Mitopunch olarak bilinen mitokondri transfer yöntemi, yüksek verimli bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Mitokondriyi çeşitli kaynaklardan çeşitli reseptör hücrelerine kalıcı olarak aktarabilir ve benzersiz mtDNA-nDNA kombinasyonlarına sahip kararlı izole edilmiş mitokondriyal alıcı hücreleri üretebilir (180).

Wu ve ark. direkt sitoplazmik transfer yoluyla küçük ve büyük materyallerin memeli hücrelerine verimli bir şekilde aktarılması için bir başka yöntem olan fototermal *nanoblade* yöntemini geliştirmiştir (181). Metabolomik analizler, *nanoblade*'in somatik memeli hücrelerinde mtDNA haplotipini değiştirmek için genel bir yaklaşım olduğunu ve ters mitokondriyal genetiğe doğru potansiyel bir ilk adım olabileceğini göstermektedir (182).

MitoCeption yöntemi ise, MKH mitokondrisi ve glioblastoma kök hücreleri kullanılarak donör hücrelerden önceden izole edilen mitokondrilerin hedef hücrelere aktarılmasına izin verir (183). Caicedo ve ark. *MitoCeption* ile aktarılan MKH hücrelerinin mitokondrilerinin, MDA-MB-231 endojen mitokondri sayısını artırma kapasitesine sahip olduğunu ve bu MKH mitokondrilerinin MDA-MB-231 hücreleri tarafından alınmasının hem enerji metabolizmasını hem de işlevselliğini artırdığını göstermiştir (184). Bununla birlikte, *MitoCeption* ekzojen olarak nakledilen mitokondrilerin en iyi şekilde tutulmasına ve mitokondriyal solunumu düzenlemek için iyi bir kapasiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (185).

Manyetik mitotransfer yönteminde, mitokondriyal transfer için antiTOM22 manyetik boncuklar ve bir manyetik plaka kullanır. Macheiner ve ark. manyetik boncuklarla birleştirilmiş mitokondriyi konakçı hücrelere aktarmak için bir mıknatıs kullanmış ve bu tekniğe manyetik mitotransfer adını vermiştir (186). Manyetik mitotransfer yöntemi, mitokondriyi hücrelere aktarmada daha etkiliydi. Kültürün ilk günü bile yüksek miktarda manyetik mitotransfer edilmiş hücre ve mitokondri olup bu transferin hızı da fazla olmuştur. Daha önemlisi, transfer edilen mitokondri,

transfer edilmiş hücrelerde solunumu güçlü bir şekilde artırdığı için işlevsel görünüyordu (186).

Yapay olarak izole edilmiş mitokondriyal transferin başka bir yöntemi, *Pep-1* aracılı bir transfer sistemidir. *Pep-1*'in hücre alımı ve hücre içi salınmasını kolaylaştıran bir şaperon görevi görme yeteneği, küçük organellerin hücreye verilmesini sağlamıştır (187).

Chan ve ark. bir feokromositoma hücre hattında (PC12) Parkinson hastalığı için mitokondriyal transplantasyonun canlılığını incelemiş ve bu çalışma 6-OHDA nörotoksitesine karşı gelişmiş mitokondriyal tolerans ve korunmuş hücre canlılığını göstermiştir (188). Aynı yöntem ayrıca insan meme adenokarsinomu hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231'de de kullanılmıştır (189).

ii. *In vivo* Mitokondri Transferi/Transplantasyonu

Son yıllarda yapılan mitokondri transplantasyonu çalışmaları nörodejeneratif, böbrek, karaciğer, kardiyovasküler ve kas-iskelet sistemi hastalıkları gibi çeşitli patolojilere yoğunlaşmıştır.

Akut iskemi (inme) modelinde, sağlıklı mitokondriler MKH'lerden izole edilip serebral arter tıkanıklığı olan şıçanların intraserebroventriküler alanına nakledilmiştir. Mitokondri transplantasyonu, azalan kan kreatin fosfokinaz seviyesini, apoptozu, astroglioz ve mikrogliya aktivasyonunu, enfarktüs boyutunu iyileştirmiş ve motor işlevi düzeltmiştir (190). Hipokampal hasar modelinde, Jia ve ark. ekzojen mitokondrinin ROT'lerin üretimini, mikrogliya ve astrositlerin çoğalmasını ve hipokampustaki nöron kaybını azalttığını bildirmiştir. Ayrıca, mitokondri transplantasyonunun sfingolipit sinyal yolağı ve karbon metabolizması gibi çoklu metabolik yolları değiştirdiğini göstermiştir (191). Beyin iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde, ekzojen mitokondri transplantasyonu, oksijene bağımlı bir şekilde hücre canlılığı artırmış, ROT ve apoptoz seviyelerini düşürmüş, nöro-davranışsal bozuklukları iyileştirmiş ve enfarktüs boyutunu azaltmıştır. Ayrıca bu çalışmada mitokondri biyodağılımı, alıcı hücrenin mitokondrisi ile birleşmiş ekzojen mitokondrinin belirli bölümlerinin olduğunu ve diğerlerinin lizozomlar tarafından

alındığını göstermiştir (192). Omurilik yaralanması modelinde, 100 µg *soleus* kasından elde edilmiş *allojenik* mitokondri floresan ile işaretlenmiş yaralı omuriliklere transfer edilmiştir. Transfer edilen mitokondriler yaralı omurilikte tedaviden 28 gün sonraya kadar tespit edilmiştir. Mitokondri transplantasyonu ile lokomotor ve duyuşal işlevlerde iyileşme gösterilmiştir. Hem *dinamin ilişkili protein* (DRP-1) ifadesi hem de yaralı omurilikteki demiyelinizasyonun şiddeti ve apoptoz/inflamasyon azalmıştır (193). Beyin iskemi modelinde, mitokondri transplantasyonu apoptozu azaltarak iskemiden 21 gün sonra daha yüksek miyelin temel proteini ve morfolojik olarak daha normal miyelinle sarılmış aksonlar olduğunu ve kortekste oligodendrosit transkripsiyon faktörü ve lipit sentezi sinyalinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (194).

DOX kaynaklı nefrotoksisite modelinde mitokondri transplantasyonu, hücreşel oksidatif stresi azaltmış ve böbrek hasarından sonra tübüler rejenerasyonu artırmıştır. Dahası tübüler hücrelerde protein birikimi azalmış ve renal işlev bozukluğunu tersine çevirmiş ve hasarlı böbrek hücrelerinde Bcl-2 düzeylerini yükseltmiş ve kaspaz-3 düzeylerini düşürmüştür (195). Diyabetik nefropati modelinde, sıçanların renal kapsülünün altına direkt enjekte edilen izole edilmiş mitokondri, tübüler hücrelerin morfolojisini ve tübüler bazal membranın ve fırça kenarının yapısını iyileştirmiştir (196). Akut böbrek hasarı modelinde, mitokondri transplantasyonu tahmini glomerüler filtrasyon hızını ve idrar çıkışını önemli ölçüde artırırken serum kreatinin ve kan üre nitrojenini azaltmıştır. Histopatolojik analiz, mitokondri verilen böbreğin akut tübüler hasarının azaldığını göstermiştir. Renal korteks IL-6 ifadesi mitokondri transplantasyonu almayan böbreklerde daha fazla olarak gösterilmiştir (197).

Asetaminofen ile oluşturulan karaciğer toksisite modelinde, mitokondri transplantasyonu karaciğerin histolojik yapısını sağlıklı sıçanlarla benzer bir seviyede iyileştirmiştir. Ayrıca plazma *alanin aminotransferaz* (ALT) seviyeleri, apoptotik hücreler ve toplam oksidan seviyeleri azalmıştır. Ancak *N-asetilsistein* (NAC) tedavisinin gruplar arasında glutatyon (GSH) düzeylerini en yüksek düzeye çıkardığı gözlenmiş ama mitokondri transplantasyonu, histolojik ve işlevşel iyileşme açısından

NAC uygulamasından daha etkili olmuştur (198). Karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulan karaciğer hasarı modelinde ise mitokondri, makropinositoz yoluyla hepatositlere girmiş ve böylece hücre canlılığı konsantrasyona bağlı bir şekilde geri kazanılmıştır. Mitokondri transplantasyonu karaciğer işlevlerini önemli ölçüde iyileştirmiş ve doku fibrogenezini önlemiştir. Transkriptomik veriler, mitokondriyal-nükleer retrograt sinyal yolağının koruyucu bir transkripsiyonel yanıtının mitokondriyal uygulamadan sonra tetikleneceğini ortaya çıkarmıştır (199). Karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde, mitokondri transplantasyonu, serum ALT seviyesinin yükselmesini, hepatosit nekrozunu, TUNEL pozitif sayılarda artışı, sitozolik sitokrom c, kaspaz 9 ve 4-hidroksinonenal ifadesini azaltmıştır (200).

Kalp iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde, mitokondri transplantasyonu, kreatin kinaz MB, kardiyak troponin-I ve apoptozu önemli ölçüde azaltmıştır. Dört haftalık iyileşmenin ardından enfarktüs boyutu da önemli ölçüde azalmıştır. Seri ekokardiyografiler, reperfüzyon başladıktan sonra 10 dakika içinde normal kasılmaya döndüğünü göstermiştir. Elektrokardiyografi hiçbir aritminin mitokondri transplantasyonu ile ilişkili olmadığını göstermiştir (201). Kalp iskemisi modelinde, mitokondri transplantasyonu kalpte düşen ejeksiyon fraksiyonunu iyileştirmiştir. Enfarktüs boyutu mitokondri alan kalplerde önemli ölçüde azalmıştır (202). Miyokardiyal koruma için, tek ve seri enjeksiyon halinde uygulanan mitokondri transplantasyon ile reperfüzyon boyunca devam eden koroner kan akımı önemli ölçüde artırmıştır. Segmental kısalma, fraksiyonel kısalma ve gerinim analizi yoluyla değerlendirilen bölgesel fonksiyonda da önemli ölçüde iyileşme gözlenmiştir. Ayrıca, enfarktüs boyutu her iki mitokondri alan grupta da önemli ölçüde azalmıştır (203). Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde, mitokondri miyokardiyuma lokal enjeksiyonla bir polipeptit, iskemik miyokart hedefli peptit ile birlikte verilmiştir. Mitokondri transplantasyonu, kardiyomiyosit enerji düzeyini ve mekanik kontraksiyonu artırarak hücrel apoptozu, makrofaj infiltrasyonunu ve proinflamatuvar yanıtını azaltmıştır (204). DOX ile indüklenen kalp yetmezliği modelinde, DOX verilmeden önceki mitokondri transplantasyonu, *in vivo* kardiyak işlevi koruyarak, miyokardiyal apoptozu önlemiş ve küçük transkriptomik

değişikliklerle distrofik kardiyomiyositlerde kontraktiletiyi artırdığını göstermiştir (205). Azalan mitokondriyal işlev, diyabetik kalplerde iskemi-reperfüzyon hasarına karşı miyokart duyarlılığını artırır. Mitokondri transplantasyonu kardiyak iskemik hasarı iyileştirebilir, ancak diyabetik sıçanlardan alınan izole mitokondriler kardiyoprotektif etkileri sınırlıdır. Diyabetik olan ve olmayan farelerden izole edilen mitokondri diyabetik miyokart iskemisi olan farelere transplante edilmiştir. Diyabetik olan ve olmayan farelerden izole edilen mitokondri transplantasyonu enfarktüs boyutunda azalma ve anti-apoptoz ile ilişkili yolların yukarı regülasyonunu sağlamıştır. Ayrıca miyokart fonksiyonunu önemli ölçüde korumuş olup, ancak diyabetik olmayan mitokondri transplantasyonu kardiyak ve kas metabolizması/gelişimi için miyokardiyal fonksiyonunun uzun süreli korunmasında daha etkili olmuştur (206).

Akut ekstremitte iskemi modelinde, 24 saatlik arka bacak reperfüzyonundan sonra, mitokondri transplantasyonu ile *gastrocnemius*, *soleus* ve *vastus medialis* kaslarında enfarktüs boyutu, apoptoz ve TUNEL-pozitif çekirdeklerde önemli bir azalma gözlenmiş olup mitokondri alan farelerde minimal kas hasarı gözlenmiştir (23). İskelet kası hasarı modelinde, mitokondri transplantasyonu farelerde sistemik inflamasyonu artırmamıştır. Yaralanmadan 7 gün sonra kas kütlesini düşürmemiş ve kas kesitlerindeki kollajen ve diğer kasılmayan doku yüzdesi daha düşük bulunmuştur. Kas ağırlığı ve maksimal kas kuvveti, yaralanmadan 14 gün sonra kontrol seviyelerine geri dönmüştür (24). Dekametazon ile oluşturulan atrofi modelinde, mitokondri transplantasyonu 1 haftada kas kütlesini 1,5 kat artırmış ve laktat konsantrasyonunu 2,5 kat azaltmıştır. Ayrıca bir kas rejenerasyon belirteci olan *desmin* protein ifadesi 2,3 kat artmış ve kasa özgü ubikülin E3-ligazları MAFbx ve MuRF-1 önemli ölçüde azalmıştır (25). Monosodyum iyodoasetat ile indüklenen osteoartrit modelinde, mitokondri transplantasyonu ağrıyı, kıkırdak yıkımını ve kemik kaybını düzeltmiştir. Kıkırdaktaki IL-1 β , TNF-a, matriks metalopeptidaz 13 ve monosit kemoatraktant protein-1'in transkripsiyon seviyeleri azalmıştır (207).

Makrofajlar, kolesterolü hücrelerden uzaklaştırmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Makrofajlar bu görevini yerine getirmemezse aterosklerotik plakların gelişimine

ve yırtılmasına katkıda bulunan aterosklerotik lezyonlar ortaya çıkabilir. Sağlıklı mitokondrilerin yüksek oranda kolesterol yüklü makrofajlara transplantasyonu, makrofaj fagositozunu indüklemiştir. 7-ketokolesterol yüklü makrofajlara mitokondri transplantasyonu, lipid birikimini azaltmış ve fagositik işlevlerini değiştirmiş ve fagositozu yeniden düzenleyerek lipid içeriğini düşürmüştür. Ek olarak, *karnitin palmitoiltransferaz 1a* (CPT1a) ifadesi ve anti-inflamatuar sitokinler yeniden düzenlenmiştir (208). Retinal pigmentli epitel hücreleri, fagositoz ve görme döngüsü metabolizması için gerekli olan enerji için yüksek mitokondri içeriğine sahiptir. Retina dejenerasyonu modelinde, mitokondri transplantasyonu, histolojik inceleme ile retina katmanlarının dejenerasyonunu azaltmıştır. Ayrıca elektriksel uyarının retinadan kortekse ulaşma zamanının korunduğu da gözlenmiştir (209). Malign melanomda, mitokondri transplantasyonunun tümör hücresi proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiş ve tümör büyümesini ve akciğer metastazını geciktirmiştir. Ayrıca, dişi hayvanlardan alınan mitokondrilerin anti-tümör aktivitesi erkeklere kıyasla daha etkili olmuştur (210). Akut akciğer hasarı modelinde mitokondri transplantasyonu, arteriyel oksijen içeriklerini (PaO_2 ve SaO_2) önemli ölçüde iyileştirmiş ve $PaCO_2$ düzeyini azaltmıştır. Mitokondri transplantasyonu yapılan hayvanların akciğer dokularında önemli ölçüde daha yüksek ATP konsantrasyonları bulunmuş ve alveolar-kapiller bariyer işlevi korunmuştur. Ek olarak, akciğer dokusuna inflammatuar hücre infiltrasyonu azalmıştır (211).

Mitokondri transplantasyonu, çeşitli mitokondri ilişkili hastalıklarda geniş bir uygulanabilirliğe sahip olup, mevcut tedavi yaklaşımlarındaki sınırlılıkların üstesinden gelme potansiyeline sahiptir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

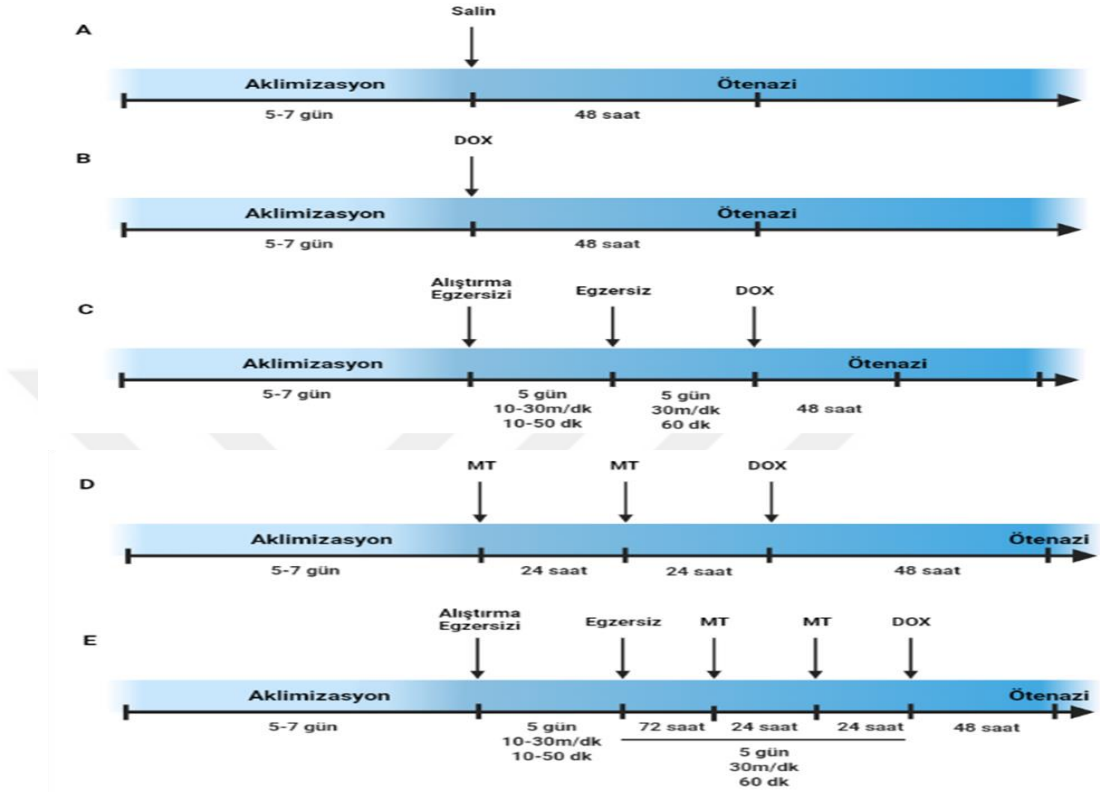
Bu tezin Etik onayı Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından alınmıştır (2022/05-03). Deneyler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D. Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Kırk dört adet 1-2 aylık erkek *Sprague Dawley* sıçan KOBAY A.Ş.'den temin edildi ve bu sıçanların kırk adeti ana deney protokolünde, dört adeti ise mitokondri izolasyonu ve mitokondriyal analizler için kullanıldı. Deney protokollerinin başlangıcından önce 12/12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, her kafeste 4 hayvan olacak şekilde bir hafta süreyle barındırılarak ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Hayvanlar adaptasyon süreci ile birlikte deney protokolleri süresince 22-26°C oda sıcaklığında ve %50-60 nem olan ortamda tutulmuştur. Deney protokolleri süresince hayvanların beslenmeleri için serbest şekilde ulaşabildikleri miktarda standart yem (%3 ham yağ, %23 ham protein, %8 ham kül, %7 ham selüloz, en az 2600 kcal) ve su verilmiştir.

3.2. Deney Grupları

Çalışmamızda kullanılacak olan sıçanlar basit rastgele örnekleme ile toplam 5 gruba ayrıldı. Adaptasyon sürecinden sonra hayvanlar doksorubisin (DOX), egzersiz ve mitokondri transplantasyon uygulamaları için aşağıdaki gruplara ayrılmıştır (Şekil 3.1.).

1. Kontrol grubu (K) (n=8): Herhangi bir işlem yapılmayan gruptur.
2. DOX grubu (D) (n=8): *Intraperitoneal* olarak 20 mg/kg tek doz DOX enjeksiyonu yapıp 48 saat sonra feda edilen gruptur.
3. DOX + Egzersiz grubu (DE) (n=8): DOX enjeksiyonundan önce egzersiz yaptırılan gruptur.
4. DOX + Mitokondri transplantasyonu grubu (DM) (n=8): DOX enjeksiyonundan önce mitokondri transplantasyonu (6,5 µg/100 µl) yapılan gruptur.

5. DOX + Egzersiz + Mitokondri transplantasyonu grubu (DEM) (n=8): DOX enjeksiyonundan önce hem egzersiz yaptırılan hem de mitokondri transplantasyonu (6,5 µg/100 µl) yapılan gruptur.



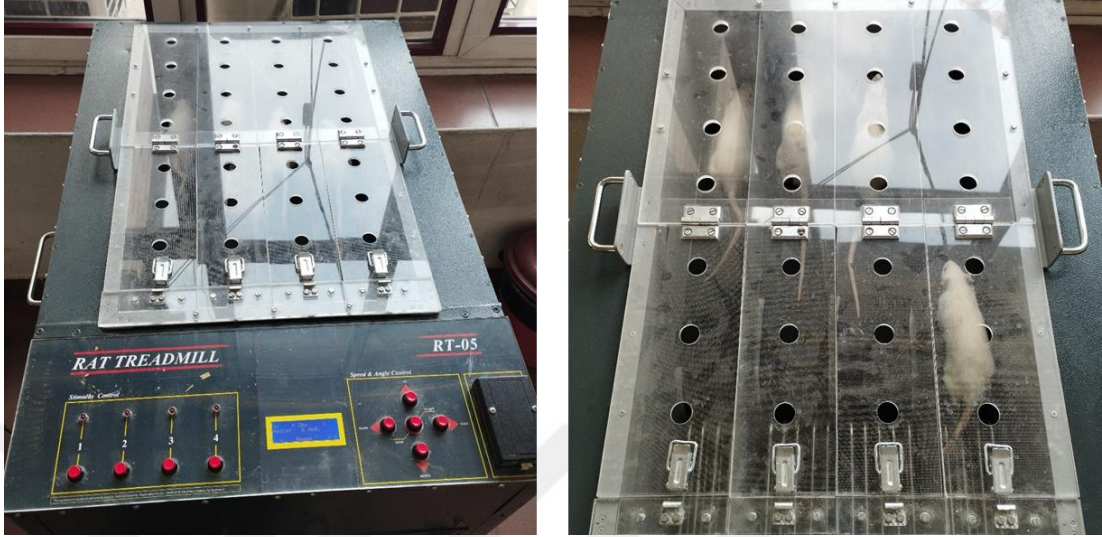
Şekil 3.1. Deney protokolü.

A. Kontrol grubu (K), B. DOX grubu (D), C. DOX + Egzersiz grubu (DE), D. DOX + Mitokondri transplantasyonu grubu (DM), E. DOX + Egzersiz + Mitokondri transplantasyonu grubu (DEM).

3.3. Egzersiz Protokolü

Egzersiz grubunda yer alan hayvanlar (DE ve DEM) koşu bandı egzersizine tabi tutuldu. Protokole göre, deney hayvanlarına özel olarak üretilmiş koşu bandı üzerinde sıçanlar ilk gün 10 m/dk hız ve 10 dk süre ile başlayan ve 5. gün sonunda 30 m/dk hız ve 50 dk süreye ulaşan alıştırma egzersizi uygulandı. Egzersize alışma süresinin tamamlanması sonrasında sıçanlar 5 gün süresince 30 m/dk hız ve 60 dk süreyle koşu bandı üzerinde orta şiddette egzersize tekabül eden şekilde koşturuldu (Şekil 3.2.). Gerek duyulması halinde hayvanları koşuya motive etmek için birkaç kez elektrik uyarısı verildi. Egzersiz protokolünü tamamlayan sıçanlar son egzersizden hemen

sonra DOX uygulanarak bundan 48 saat sonra derin anestezi altında ötenazi edildi (212).



Şekil 3.2. Sıçanlar için üretilmiş motorize koşu bandı.

3.4. Doksorubisin Enjeksiyonu

Rastgele yöntemle ayırdığımız gruptaki sıçanlara (kontrol grubu hariç) deneysel iskelet kası atrofisi modelini oluşturmak üzere *intraperitoneal* olarak 20 mg/kg tek doz DOX verildi (39).

3.5. Kas Dokusundan Mitokondri İzolasyonu ve Mitokondri Transplantasyonu

200 mg sıçan kas dokusundan (deney gruplarından ayrı başka bir sıçanın *biceps femoris* kasından) alındı ve ticari kit (*Biovision*, ABD) kullanılarak aşağıdaki yöntemle mitokondri izolasyonu yapıldı:

1. *Biceps femoris* kas dokusu (yaklaşık 200 mg) makas ile küçük parçalara ayrıldı ve buz üzerinde 1 ml mitokondri izolasyon tamponu (MİT) içinde iki kez yıkandı.
2. Doku örneği 10.000 xg hızda 2 dakika santrifüjlendi. Doku daha sonra önceden soğutulmuş bir cam homojenizatör kullanılarak 2 ml MİT içinde homojenize edildi.
3. Homojenat bir tüpe aktarıldı ve 600 xg hızda 10 dakika 4°C'de santrifüjlendi.
4. Süpernatant ayrı bir tüpte toplandı ve 7.000 xg hızda 10 dakika 4°C'de santrifüjlendi.

5. Süpernatant atıldı ve izole mitokondriler MİT ile yıkandı.

6. İzole mitokondrileri korumak için üzerine *storage* tampon konuldu. Transplantasyon için kullanılacak tüm mitokondriler 1 saat içinde izole edildi.

İzole edilen mitokondriler direkt enjeksiyon ile sıçanların *tibialis anterior* (TA) kaslarına üç farklı noktadan verildi. DM ve DEM gruplarındaki hayvanlara, DOX enjeksiyonundan 48 saat önce başlayarak Şekil 3.3’de gösterildiği gibi günlük olarak izole edilmiş mitokondri enjeksiyonu yapıldı (Şekil 3.3). 100 µL *storage* tampon içinde toplam 6,5 µg izole edilmiş mitokondri, insülin enjektörü ile her bir TA kasına uygulandı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. *Tibialis anterior* kasına mitokondri transplantasyonu.

3.6. İzole Edilen Mitokondrilerin Membran Potansiyeli Analizi

İzole edilen mitokondrilerin membran potansiyelini belirlemek için, 5,6,6-*tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzi-midazolylcarbocyanineiodide* (JC-1) ile boyanmış izole mitokondrilerin floresan mikroskop ile analizi yapıldı. JC-1 boyası, biriktiği mitokondriye girebilen ve konsantrasyona bağlı bir şekilde J agregatları adı verilen kompleksler oluşturmaya başlayan lipofilik, katyonik bir boyadır (213). Sağlıklı

mitokondriler floresan mikroskop altında kırmızı renk oluşturacaktır. İzole edilen mitokondriler (6,5 µg/100 µl protein), karanlıkta JC-1 boyası ile 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından yine karanlıkta 10 µl boyanmış mitokondri lam üzerine yayıldı ve hemen floresan mikroskopta incelendi ve *Nikon imaging system (NIS) element* yazılımı ile görüntüler alındı.

3.7. İzole Edilen Mitokondrilerin Membran Bütünlüğü Analizi

Storage tampon içinde (10 µL) yeni izole edilmiş mitokondri, lamlar üzerinde dağıtıldı ve ardından 10 µL (100 nM) *MitoSpy Green FM* ve *MitoTracker Red CMXRos* boyama solüsyonu ilave edildi ve 37° C'de 10 dk inkübe edildi ve hemen floresan mikroskopta incelendi ve *NIS element* yazılımı ile görüntüler alındı (198).

3.8. İzole Edilen Mitokondrilerin Protein Analizi

İzole edilmiş mitokondrinin protein içeriği, ticari bir kit olan *bicinchoninic acid* (BCA) protein analiz kiti (*Thermo Scientific*, ABD) kullanılarak tespit edildi.

3.9. Histolojik Analizler

3.9.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Lif Enine Kesit Alanı Ölçümü

Hayvanlardan izole edilen TA kasları %4 formaldehit ile fikse edildi. Histolojik analizler için kas dokusu örnekleri doku takip cihazında (*Sakura, Tissue TEK*) takip işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde örnekler formalin, alkol, ksilen ve parafinden sırayla geçirildi. Takip sonrası örnekler doku bloklama cihazında (*Sakura, Tissue TEK*) parafin bloklar haline getirildi. Parafin bloklar mikrotom cihazında (*Leica RM2255*) adezivli lamlara 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınarak lam boyama cihazında (*Sakura, Tissue TEK*) hematoksilen-eozin boyaması yapıldı. Arka arkaya alkol ve ksilen işlemlerinden geçtikten sonra lam kapama solüsyonu damlatılarak lamel ile kapatıldı. Her lifin enine kesit alanı, ışık mikroskobu (*Nikon Eclipse 80i*, Japonya) kullanılarak belirlendi. Her kesitin beş farklı alanından 250 kas lifi, yazılım programı (*NIS Element 3.0 Japan*, x200 büyütme) kullanılarak değerlendirildi.

3.9.2. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyaması ile Lif Glikojen Oranı

Kas liflerindeki glikojen içeriğini ölçmek için, hayvanlardan izole edilen TA kasları %4 formaldehit ile fikse edildi. Histolojik analizler için kas dokusu örnekleri doku takip cihazında (*Sakura, Tissue TEK*) takip işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde örnekler formalin, alkol, ksilen ve parafinden sırayla geçirildi. Takip sonrası örnekler doku bloklama cihazında (*Sakura, Tissue TEK*) parafin bloklar haline getirildi. Parafin bloklar mikrotom cihazında (*Leica RM2255*) adhezivli lamlara 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Lamalar, fosfat tampon *salin* (PBS) içinde 5 dk süreyle iki kez ve distile su içinde 60 saniye süreyle bir kez durulandı. Lamalar daha sonra 5 dk %1 periyodik asitle, 1 dk akan musluk suyuyla ve 10 saniye deiyonize suda yıkandı. Daha sonra lamalar oda sıcaklığında 15 dk *Schiff* reaktifinde inkübe edildi. Arka arkaya alkol ve ksilen işlemlerinden geçtikten sonra lam kapama solüsyonu (*entellan*) damlatılarak lamel ile kapatıldı. Glikojen yoğunluğunun analizi, bir ışık mikroskobu (*Nikon Eclipse 80i*, Japonya) ve *NIS elements* yazılımı (*NIS Element 3.0* Japonya, x200 büyütme) kullanılarak on farklı alandan ölçüldü. Sonuçlar optik yoğunluk indeksi olarak verildi. (214).

3.9.3. Süksinat Dehidrogenaz (SDH) Boyaması ile Mitokondriyal Enzim Aktivitesi

SDH enzimatik aktivitesi için kriyotom kullanılarak 8 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamalar üzerine alındı. Daha sonra kesitlerin üzerine substrat olarak sodyum süksinat ve reaksiyon için nitro-mavi tetrazolyum (NBT) içeren bir SDH inkübasyon solüsyonu damlatıldı ve 37°C'de 40 dk süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda üç farklı PBS yıkamasından sonra slaytlar gliserol damlatılarak lamel ile kapatıldı. SDH analizi optik yoğunluk ölçümü ile ışık mikroskobu (*Nikon Eclipse 80i*, Japonya) kullanılarak değerlendirildi ve görüntü analiz sistemi (*NIS Element 3.0* Japonya, x200 büyütme) kullanılarak ölçüldü. Optik yoğunluk, beş farklı alandan toplam 100 lif için değerlendirildi (215).

3.10. Biyokimyasal Analizler

3.10.1. Kan Örnekleri Analizleri

Kan numuneleri (8 mL) serum tüplerinde (*BD Vacutainer*) toplandı ve pıhtılaşmaya bırakıldı ve ardından santrifüjlendi (1400 xg, 10 dk). Kan üre, laktat dehidrogenaz (LDH), ALT ve aspartat aminotransferaz (AST) analizleri *Beckman Coulter Autoanalyzer AU 680* cihazında fotometrik yöntemle yapıldı.

3.10.2. Kas Doku Örnekleri Analizleri

Kas doku örneklerinde toplam antioksidan seviyesi (TAS) ve toplam oksidan seviyesi (TOS) ölçümleri yapıldı. Bunun için öncelikle dokular homojenize edildi. Daha sonra elde edilen verilerin sayısal olarak ifade edilebilmesi için bahsedilen ölçümlerin yanında doku protein ölçümleri yapıldı.

i. Dokuların Homojenizasyonu

Homojenizasyon işlemi için *tibialis anterior* kas dokusu örnekleri -80°C'den çıkarılarak 100 mg olarak tartıldı. Ardından mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve 1/9 oranında uygun tampon (PBS- fosfat tampon *salin*) eklenerek homojenizatörde (*Retsch-MM400*) homojenize edildi. Homojenatlar 4°C' de 10000 *rcf* hızında 10 dk boyunca santrifüj edildi (*KUBOTA 5500*). Süpernatantlar TAS ve TOS analizleri için parçalara ayrılarak -80°C' de derin dondurucuda saklandı.

ii. Protein Ölçümü

BCA protein ölçümleri doku örnekleri kullanılarak kit protokolüne göre yapıldı (*BCA Protein Assay - Thermo-ABD*). Standartlar için 2 mg/ml sığır serum albümin (BSA) solüsyonu azalan seri dilüsyonlar halinde hazırlandı. Mikroplakaya 20 µl hacimde standartlar ve ardından 20 µl hacimde numuneler yüklendi. Standartlar ve doku örnekleri iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Üzerlerine 200 µl çalışma solüsyonu koyuldu (Çalışma solüsyonu: 50 birim *Reagent A*+ 1 birim *Reagent B*). İyice karıştırıldı

ve 37°C'de 30 dk inkübasyondan sonra spektrofotometrede (*Allsheng AMR-100-ELISA okuyucu*) 562 nm dalga boyunda okundu.

iii. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

TAS ölçümleri kas dokusu örnekleri kullanılarak kit protokolüne göre yapıldı (*Total Antioxidant Status, -Rel Assay Diagnostics- Türkiye*). Analizler için doku örnekleri, standartlar ve su, 18 µl üzerine 300 µl *Reagent 1* eklenerek iyice karıştırıldı 30 saniye sonra 1. absorbanslar 660 nm dalga boylarında okundu. Sonra üzerlerine 45 µl *Reagent 2* eklenerek iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyondan sonra 2. absorbanslar 660 nm dalga boyunda okundu. TAS değerleri 1. ve 2. ölçümler kullanılarak kitte istenen formüle göre hesaplandı. Sonuçlar hesaplandıktan sonra BCA analizleri ve sulandırma katsayısı faktörlerine uygun şekilde normalize edildi ve hesaplandı.

TAS (mmol): $(\Delta Abs_{H_2O} - \Delta Abs_{\text{örnek}}) / (\Delta Abs_{H_2O} - \Delta Abs_{\text{standart}})$

(A1): Birinci okuma absorbansları

(A2): İkinci okuma absorbansları

(ΔAbs): A2-A1

TOS ölçümleri kas dokusu örnekleri kullanılarak kit protokolüne göre yapıldı (*Total Oxidant Status, Elabsciences-ABD*). Analizler için doku örnekleri, standartlar ve su, 96 kuyucuklu plakalara 20 µl olacak şekilde yüklendi. Üzerine 200 µl *Reagent 1* eklenerek iyice karıştırıldı 30 saniye sonra 1. absorbanslar 590 dalga boylarında okundu. Sonra üzerlerine 50 µl *Reagent 2* eklenerek iyice karıştırıldı. 37°C'de 5 dk inkübasyondan sonra 2. absorbanslar 590 dalga boylarında okundu. TOS değerleri 1. ve 2. ölçümler kullanılarak kitte istenen formüle göre hesaplandı.

TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv.}/\text{g}_{\text{protein}}$)= $(\Delta A_{590}-b) / a / C_{pr} \times f$

(ΔA_{590}): Örneklerin absorbanslarından boş kuyucuk absorbansının çıkarılması

(a): Standart eğrisinin eğimi

(b): Standart eğrisinin y eksenini kestiği nokta

(C_{pr}): Protein konsantrasyonları

(f): Sulandırma katsayısı

3.11. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler için, formalinde tespit olmuş, parafine gömülü TA kas dokusu örneklerinden hazırlanan 4-5 µ kalınlıktaki kesitler kullanıldı. Doku kesitleri, pozitif yüklü lamlara (*TOMO*, Japonya) alındı ve 70°C'da en az 45 dk kuruması sağlandı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri ile birlikte tüm immünohistokimyasal boyama aşamaları tam otomatik immünohistokimya boyama cihazı (*Ventana BenchMark XT*, *Ventana Medical Systems*, *Tucson, AZ*) kullanılarak gerçekleştirildi. İşlem için, biyotinsiz, *horseradish peroksidaz* (HRP) multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3,3'- diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojenden oluşan hazır kit (*ultraView™ Universal DAB Detection Kit*, Katolog no: 760-500, *Ventana Medical Systems*, *Tucson, AZ*) kullanıldı. Antikor olarak kaspaz 3 (*Thermo Monoklonal Rabbit*, 1:100), NF-κB (*Santa Cruz Rabbit Monoclonal Antibody* 1:100-1:500), DRP-1 (*Santa Cruz Rabbit Monoclonal Antibody* 1:100-1:500), Mitofusin-2 (MFN-2) (*Santa Cruz Rabbit Monoclonal Antibody* 1:100-1:500) uygulandı. Zıt boyama için boyama cihazında, hematoksilen ve mavileştirici solüsyon yapıldı. Kesitler daha sonra seri alkollerden geçirilerek dehidratasyon ve seri ksilenden geçirilerek şeffaflandırılması yapıldı. Daha sonra lamel ile kapatıldı. Sonuçlar bir mikroskop (*Nikon E 600*, Japonya) ile kör olarak Tablo 3.1.'de belirtildiği gibi skorlandı.

Tablo 3.1. Kaspaz-3, NF-κB, DRP-1 ve MFN-2 boyama alanı ve yoğunlukları skorlama tablosu

	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3
1. Kaspaz-3 2. NF-κB 3. DRP-1 4. MFN-2 İfadeleri Boyama Alanı ve Yoğunlukları	%5 ve altı	%5-25	%26-50	%51ve üzeri

NF-κB: Nükleer faktör-kappa B, DRP-1: Dinamin ilişkili protein, MFN-2: Mitofusin 2.

3.12. İstatistiksel Analiz

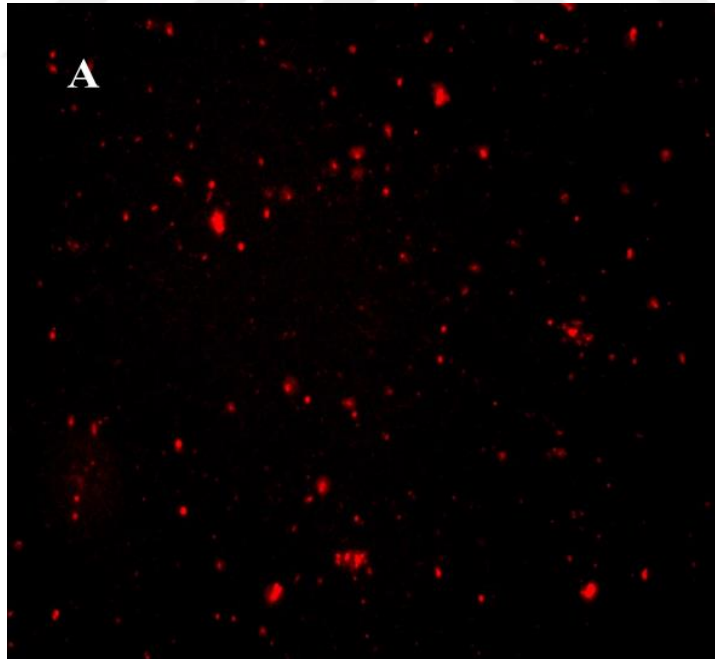
Tüm istatistiksel analizler *Microsoft IBM SPSS v23.0* programı kullanılarak yapıldı. İlk olarak toplanan veriler tanımlayıcı istatistiksel analize alındı, çarpıklık ve basıklık verileri analiz edildi ve dağılımlarının normal dağılım göstermediği saptandı. Verilerin normal dağılım göstermemesi ve karşılaştırılacak grup sayısı beş olduğu için en uygun istatistiksel analiz *Kruskal-Wallis* olarak belirlendi ve tüm parametrelerde bu yöntem kullanıldı. Anlamlı farklılıkların olduğu parametrelerde farkın nereden ve hangi gruptan kaynaklandığı *post-hoc Dunn* testi ile belirlendi. Yapılan analizlerde *P* değeri 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı kabul edildi. Grafikler kutu grafiği şeklinde çizildi, ortanca, en küçük ve en büyük değerler, çeyrekler arası genişlik değerleri grafik içerisinde gösterildi. Hazırlanan tablolarda ise ortanca ve çeyrekler arası genişlik (*interquartile range (IQR)*) verileri verildi.

4. BULGULAR

4.1. İzole Edilen Mitokondrilerin Membran Bütünlüğü ve İşlevlerinin Analizleri

4.1.1. İzole Edilen Mitokondrilerin Floresan Mikroskop ile Membran Potansiyeli Analizleri

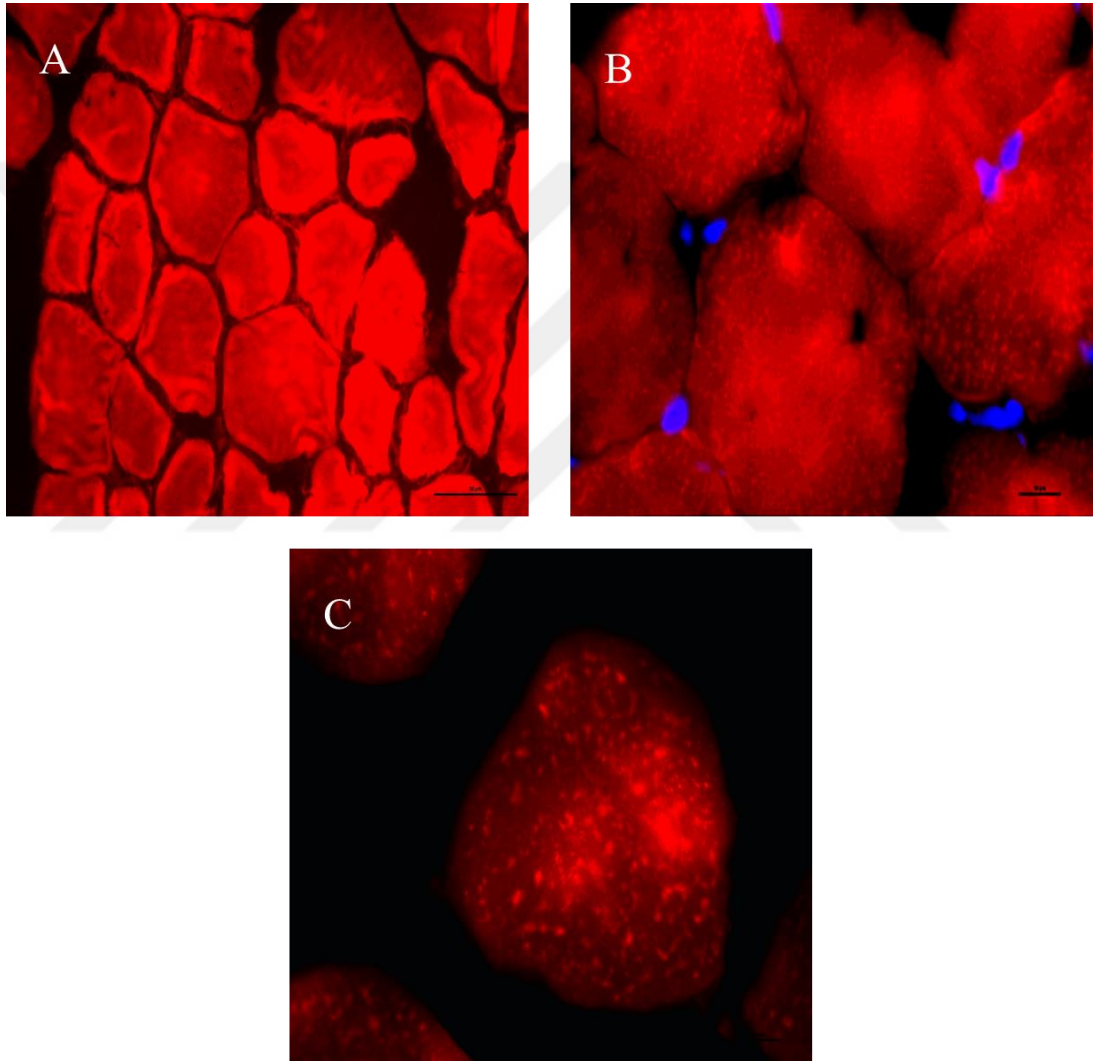
Deney hayvanlarına transplant edilecek mitokondriler, kaynak olarak kullanılan *biceps femoris* kasından izole edildikten sonra JC-1 boyası ile boyanarak floresan yoğunluğu görüntülendi (Şekil 4.1). Mitokondride proton pompaları (Kompleks I, III ve IV) tarafından üretilen mitokondriyal membran potansiyeli, oksidatif fosforilasyon sırasında enerji depolama sürecinde önemli bir bileşendir. İzolasyon sonrası elde edilen mitokondrilerin membran potansiyelini koruduğu ve izolasyon yönteminin başarıyla uygulanarak transplant edilecek mitokondrilerin hasar görmesinin önüne geçildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. İzole edilen mitokondrilerin JC-1 ile boyandıktan sonra floresan mikroskop ile gösterilmesi (Bar: 10 μ m x1000 büyütme, JC-1).

4.1.2. Kas İçi *MitoTracker Red CMXROS* ile Mitokondrilerin Boyanması ve Floresan Mikroskobu Analizleri

Mitokondri izolasyonu yapılacak *biceps femoris* kasına ait mitokondriler *MitoTracker Red CMXROS* boyası ile çekirdekler ise *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) ile boyanarak floresan yoğunluğu görüntülendi. Mitokondrilerin membran bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).

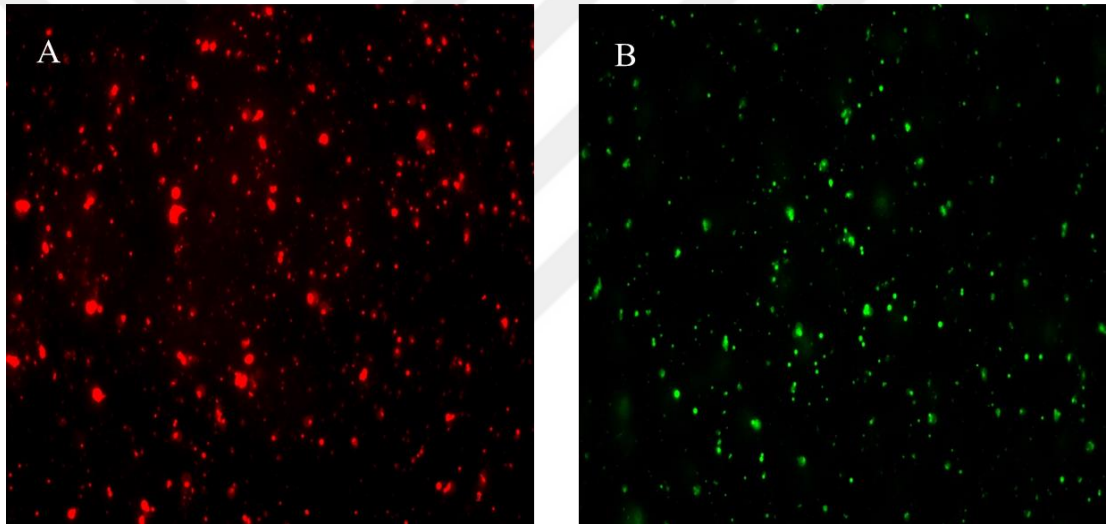


Şekil 4.2. Mitokondri izolasyonu için kaynak olarak kullanılan *biceps femoris* kası içindeki mitokondrilerin floresan mikroskop ile gösterilmesi.

A: *Biceps femoris* kası lifleri, *MitoTracker Red CMXROS*, Bar: 50 μ m x200 büyütme. B: *Biceps femoris* kası lifleri, *MitoTracker Red CMXROS* ve DAPI, Bar: 10 μ m x1000 büyütme. C: *Biceps femoris* kası lifleri, *MitoTracker Red CMXROS*, Bar: 10 μ m x1000 büyütme.

4.1.3. İzole Edilen Mitokondrilerin *MitoTracker Red CMXRos* ve *MitoSpy Green FM* ile Boyanması ve Floresan Mikroskopu Analizleri

Deney hayvanlarına nakledilecek mitokondriler, kaynak olarak kullanılan *biceps femoris* kasından izole edildikten sonra ayrı ayrı *MitoTracker Red CMXRos* ve *MitoSpy Green FM* boyası ile boyanarak floresan yoğunluğu görüntülendi (Şekil 4.3). İzolasyon sonrası elde edilen mitokondrilerin canlılıklarının ve membran bütünlüklerinin korunduğu izlendi. Elde edilen bu görüntülerle izolasyon yönteminin başarıyla uygulanarak transplant edilecek mitokondrilerin hasar görmesinin önüne geçildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. İzole edilen mitokondrilerin floresan mikroskop ile gösterilmesi.

A: İzole mitokondriler, *MitoTracker Red CMXRos*, Bar: 10 µm x1000 büyütme. B: İzole mitokondriler, *MitoSpy Green FM*, Bar: 10 µm x1000 büyütme).

4.1.4. İzole Edilen Mitokondrilerin Protein Ölçümleri

Toplam izole edilmiş mitokondrilerin protein konsantrasyonu, BCA yöntemi ile belirlendiği üzere yaklaşık 109,8 µg/mL olarak gösterildi.

4.2. Vücut ve Kas Ağırlığı Bulguları

Çalışmada yer alan hayvanların başlangıç vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde D grubuna göre DE grubu düşüktü ($P < 0,05$). DM grubu; D, DE ve DEM gruplarına göre

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($P < 0,05$). Son vücut ağırlıkları (SVA) değerlendirildiğinde ise D grubuna göre DM, DE ve DEM grupları yüksekti ($P < 0,05$). K grubuna göre DM ve DE grupları yüksekti ($P < 0,05$). TA kasının son vücut ağırlığına oranı değerlendirildiğinde (TA kası-mg/SVA-gr), DE ve DEM gruplarında K ve DM grubuna göre yüksekti ($P < 0,05$). Ayrıca DE grubunda D grubuna göre anlamlılığa çok yakın bir artış olduğu görülmektedir ($P = 0,052$).

Tablo 4.1. Vücut ve kas ağırlığı bulguları (Median $\pm$ Interquartile Range (IQR)).

	K (n=8)	D (n=8)	DM (n=8)	DE (n=8)	DEM (n=8)
TA (mg)	410 $\pm$ 49,57	420 $\pm$ 27,77	441,3 $\pm$ 42,91	480 $\pm$ 46,29 ^a	471,3 $\pm$ 20,31 ^a
SVA (g)	255 $\pm$ 20,25	250 $\pm$ 8,75	264 $\pm$ 36 ^{a,c}	268,5 $\pm$ 23,50 ^{a,c}	260 $\pm$ 13,75 ^c
TA/SVA (mg/g)	1,657 $\pm$ 0,321	1,700 $\pm$ 0,207	1,620 $\pm$ 0,225	1,834 $\pm$ 0,155 ^{a,b}	1,787 $\pm$ 0,133 ^{a,b}

TA: *Tibialis anterior*, SVA: Son vücut ağırlığı, K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

b: DM grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

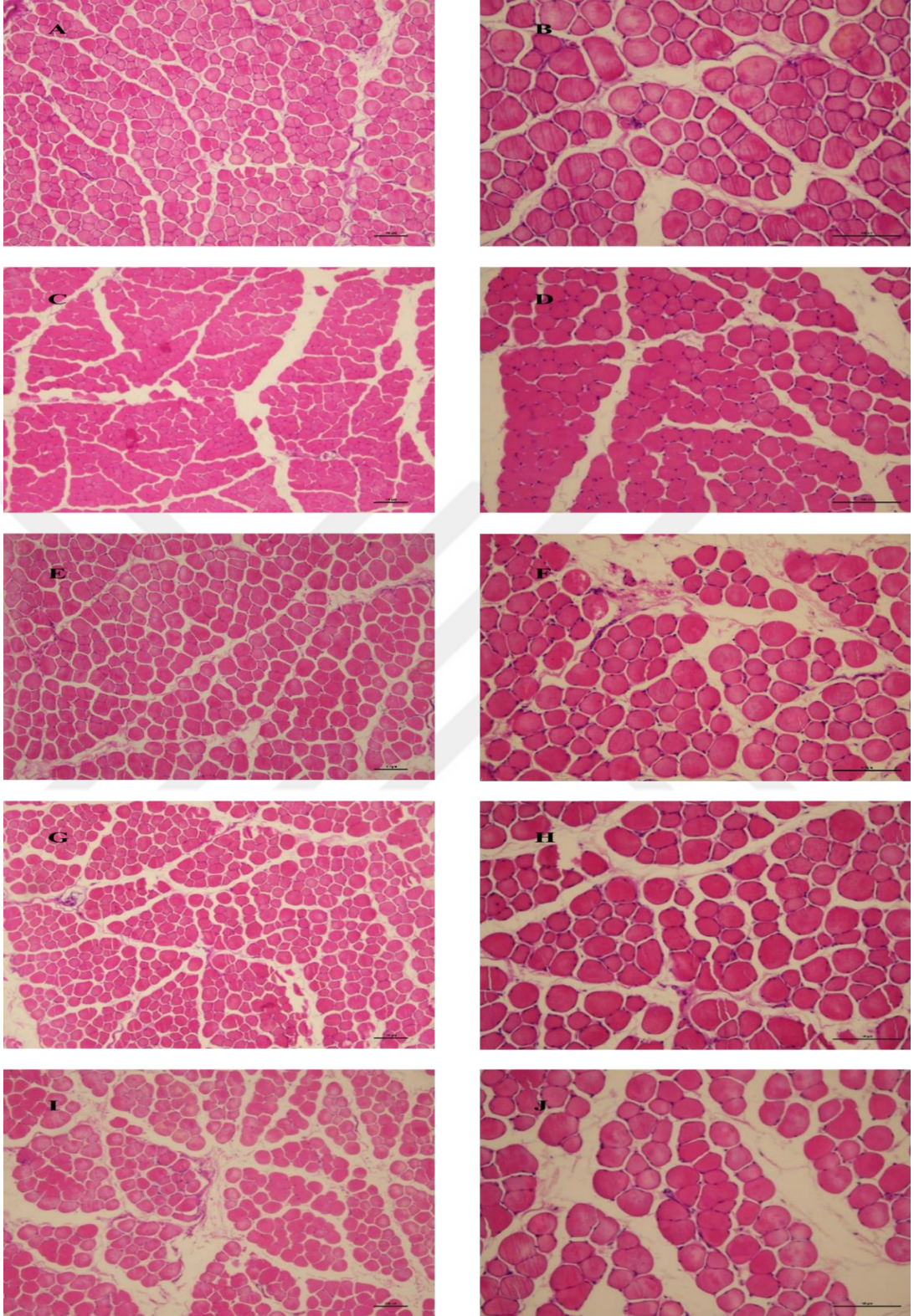
c: D grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

* DE grubu D grubuna göre anlamlılığa çok yakın bir artış olduğu görülmektedir ($P = 0,052$) (TA/SVA).

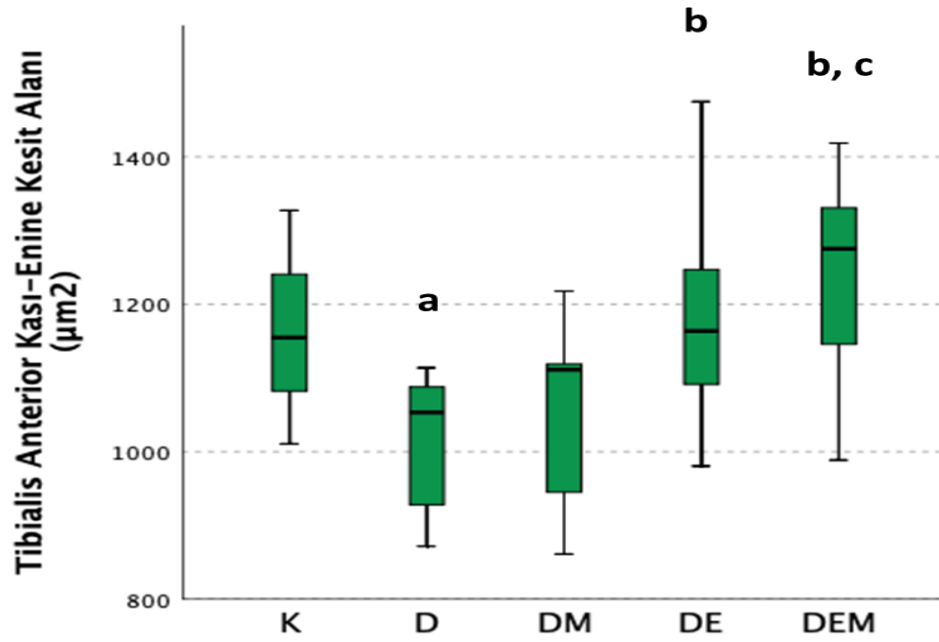
4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Lif Enine Kesit Alanı Analizleri

TA kası lif çapı analizleri her kas için 250 kas lifi kullanılarak tüm sıçan gruplarında belirlendi (Şekil 4.4.). TA kasındaki liflerin çapı D grubunda K grubuna kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü (Şekil 4.4. A, B, C, D ve Şekil 4.5.) ($P < 0,05$). DE ve DEM gruplarında D grubuna göre yüksekti (Şekil 4.4. C, D, G, H, I, J ve Şekil 4.5.) ($P < 0,05$). Ayrıca DEM grubu DM grubuna göre yüksekti (Şekil 4.4. G, H, I, J ve Şekil 4.5.) ($P < 0,05$).



Şekil 4.4. *Tibialis anterior* kasının enine kesit alanı görüntüleri. K grubu (A, B), D grubu (C, D), DM grubu (E, F), DE grubu (G, H) ve DEM grubu (I, J) (Bar: 100 μ m x100 büyütme ve Bar: 10 μ m x 200 büyütme).



Şekil 4.5. *Tibialis anterior* kasının enine kesit alanı analizleri.

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

b: D grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

c: DM grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

Tablo 4.2. *Tibialis anterior* kasının enine kesit alanı analizleri (Median ± Interquartile Range (IQR)).

	K (n=8)	D (n=8)	DM (n=8)	DE (n=8)	DEM (n=8)
TA Kasi- Enine Kesit Alanı/µm ²	1154,7±176,6	1053,21±163,51 ^a	1111,37±216,75	1163,75±159,82 ^b	1275,15±189 ^{b,c}

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

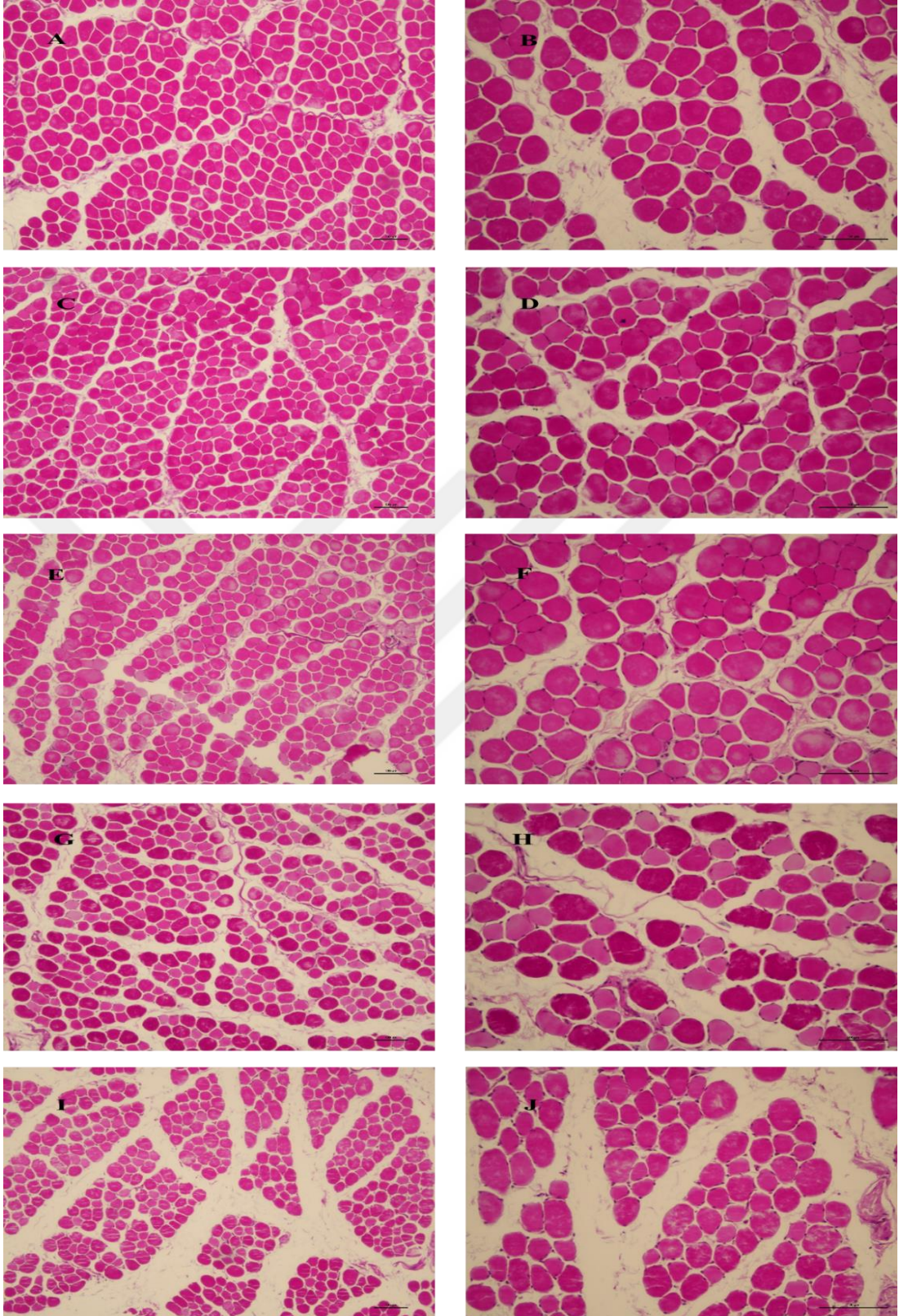
b: D grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

c: DM grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

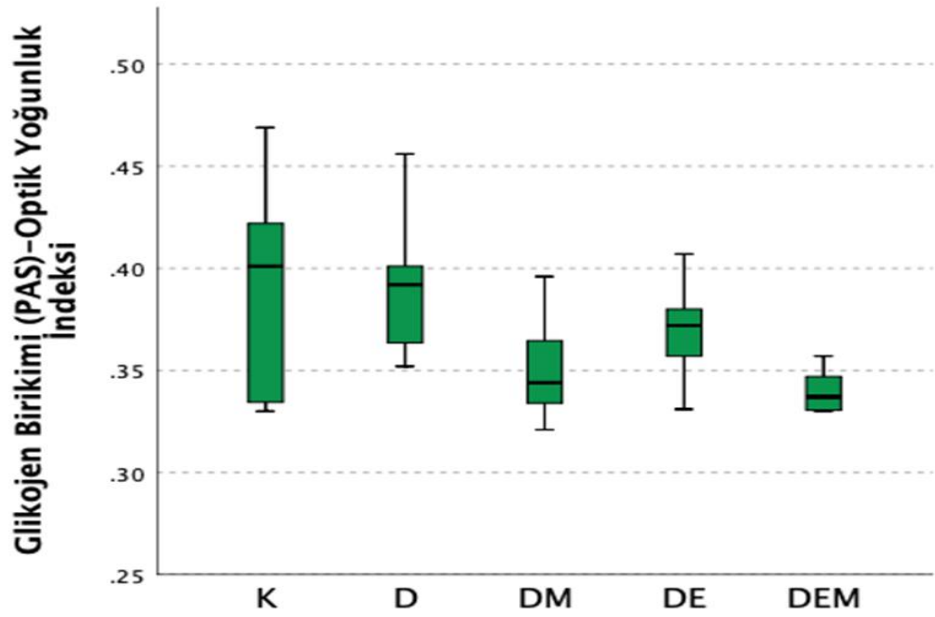
4.3.2. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyaması ile Lif Glikojen Oranı

TA kası için, iskelet kasındaki glikojen dağılımı (optik yoğunluk indeksi), DOX uygulamasından sonra D grubunda iskelet kası liflerinde glikojen dağılımı yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.6. A, B, C, D ve Şekil 4.7.). İskelet kası liflerinde glikojen dağılımı DM, DE ve DEM gruplarında K ve D gruplarına göre azaldı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.6. E, F, G, H, I, J ve Şekil 4.7.).





Şekil 4.6. *Tibialis anterior* kasının glikojen (optik yoğunluk indeksi) görüntüleri: K grubu (A, B), D grubu (C, D), DM grubu (E, F), DE grubu (G, H) ve DEM grubu (I, J) (Bar: 100 μ m x100 büyütme ve Bar: 10 μ m x 200 büyütme).

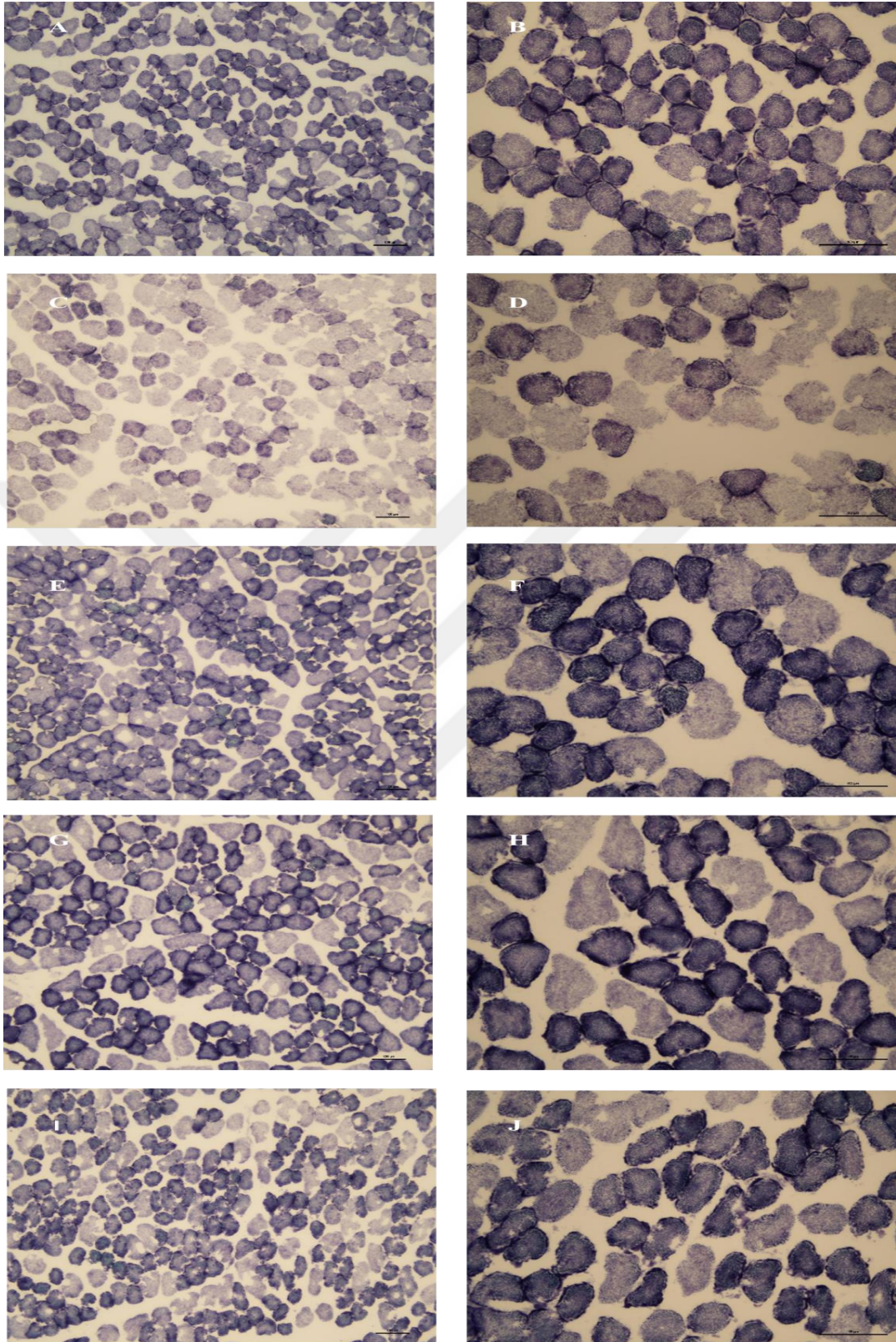


Şekil 4.7. *Tibialis anterior* kasının glikojen (optik yoğunluk indeksi) analizleri.

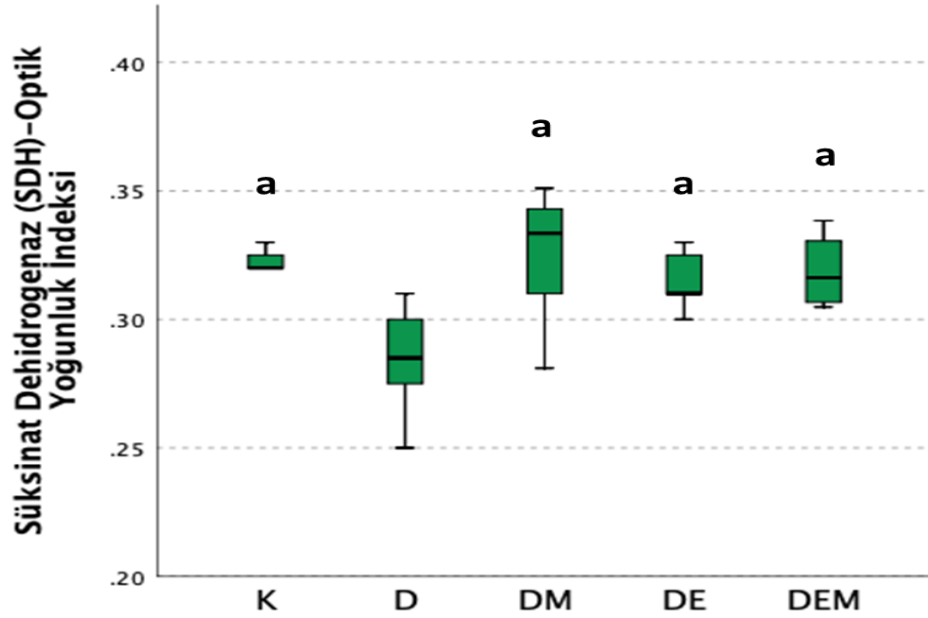
K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

4.3.3. Süksinat Dehidrogenaz (SDH) Boyaması ile Mitokondriyal Enzim Aktivitesi

TA kası için, iskelet kasındaki SDH mitokondriyal enzim aktivitesi, DOX uygulamasından sonra D grubunda azalmıştır. Bununla birlikte D grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda yüksek bulundu ($P < 0,05$). Bunun sebebi, egzersizin ve mitokondri transplantasyonunun mitokondri enzim aktivitesini artırmasıdır (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. *Tibialis anterior* kasının süksinat dehidrogenaz (SDH) (optik yoğunluk indeksi) görüntüleri. K grubu (A, B), D grubu (C, D), DM grubu (E, F), DE grubu (G, H) ve DEM grubu (I, J) (Bar: 100 μ m x100 büyütme ve Bar: 10 μ m x 200 büyütme).



Şekil 4.9. *Tibialis anterior* kasının süksinat dehidrogenaz (SDH) (optik yoğunluk indeksi) analizleri.

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: D grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

Tablo 4.3. *Tibialis anterior* kasının süksinat dehidrogenaz (SDH) (optik yoğunluk indeksi) analizleri. (Median $\pm$ Interquartile Range (IQR)).

	K (n=8)	D (n=8)	DM (n=8)	DE (n=8)	DEM (n=8)
SDH-Optik Yoğunluk İndeksi	0,320 $\pm$ 0,075 ^a	0,285 $\pm$ 0,028	0,3335 $\pm$ 0,04 ^a	0,31 $\pm$ 0,02 ^a	0,3162 $\pm$ 0,025 ^a

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: D grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

4.4. Biyokimyasal Bulgular

Tablo 4.4. Biyokimyasal Bulgular (Median± *Interquartile Range* (IQR)).

	K (n=8)	D (n=8)	DM (n=8)	DE (n=8)	DEM (n=8)
Üre (mg/dL)	38±8,3	64,65±38,3 ^a	47±17,3 ^a	36,60 ± 6,75 ^{b,c}	48,35 ± 16,65
LDH (U/L)	399±839,3	739,5±779,3	981,5±901,3	384,5 ± 986,5	489 ± 479,8
ALT (U/L)	36,9±12,4	64,20±31,4	116,2±94,9 ^a	94,60 ± 43,6 ^a	88,85 ± 40,6 ^a
AST (U/L)	87,3±34,5	163±77,6	185,85±96,6	140,60 ± 75,6	179 ± 53,5
TAS (mmol/L)	0,054±0,06	0,099±0,04	0,111±0,18	0,112± 0,24 ^a	0,162 ± 0,26 ^a
TOS (μmol/L)	25,99±7,23	22,42±4,51	24,89±05,43	20,69 ± 3,52 ^{a,b}	21,38 ± 4,35

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

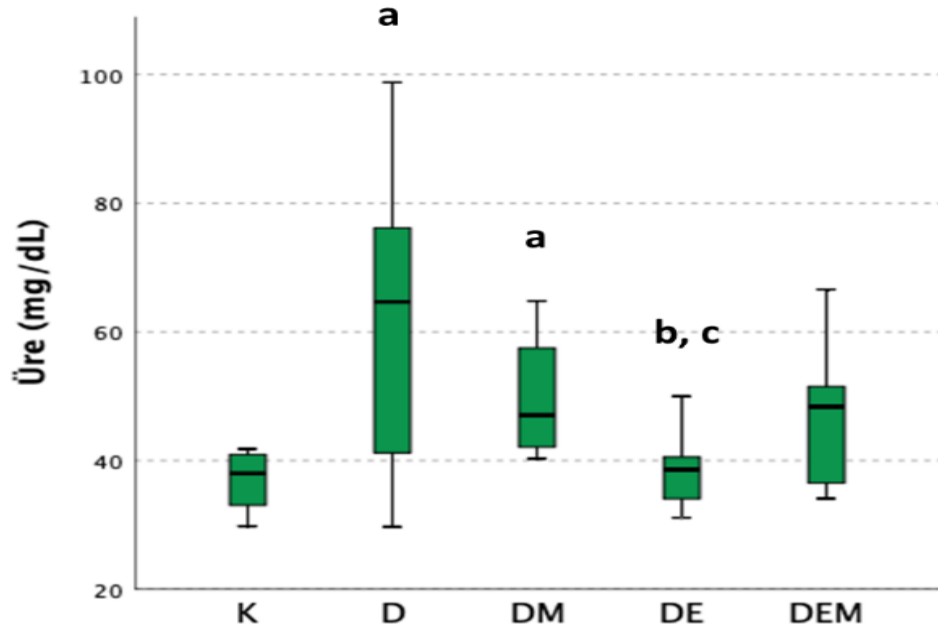
b: DM grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

c: D grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

4.4.1. Kan Örneklerine Ait Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular

i. Üre

Serum üre analizlerinde K grubuna göre D ve DM gruplarında artış bulunmaktadır ($P < 0,05$). DE grubunda D ve DM gruplarına göre azalış bulunmaktadır ($P < 0,05$). Bu durum DOX uygulamasının böbrek toksisitesine neden olduğunu göstermekte ve oluşturulan kas atrofisi modelini desteklemektedir (Şekil 4.10.).



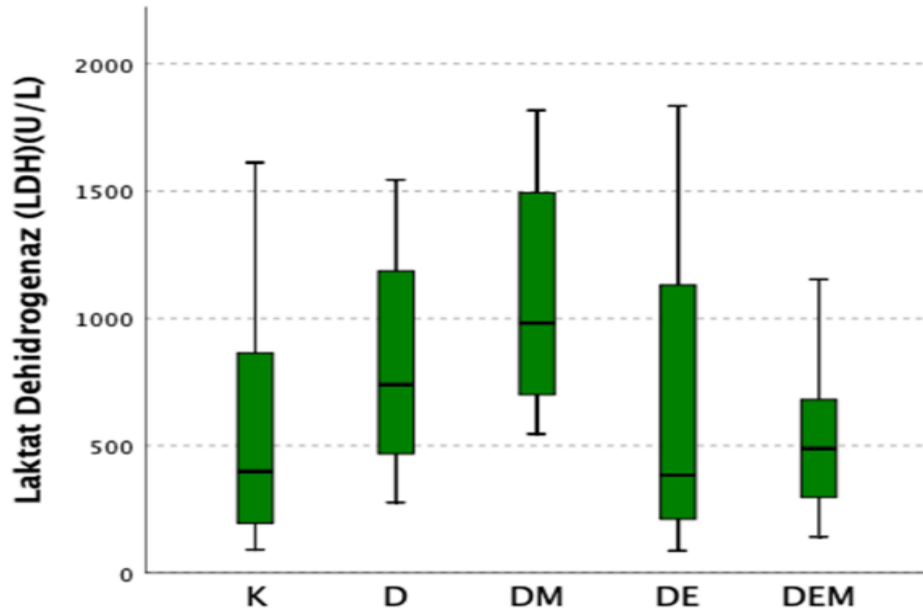
Şekil 4.10. Serum üre düzeyleri (mg/dL).

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

- a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)
- b: DM grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)
- c: D grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

ii. Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Serum LDH analizlerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır. Ancak DE ve DEM gruplarında azalış görülmektedir (Şekil 4.11.). Bu durum egzersizin DOX'un yol açtığı kas hasarına karşı olumlu etkisini düşündürmektedir.

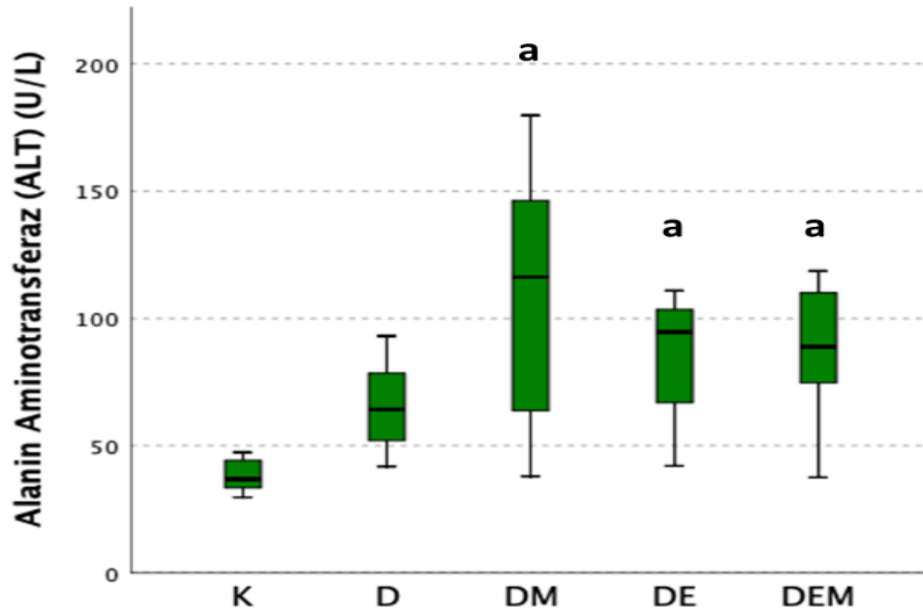


Şekil 4.11. Serum laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri (U/L).

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

iii. Alanin Aminotransferaz (ALT)

Serum ALT analizlerinde K grubuna göre DM, DE ve DEM gruplarında anlamlı düzeyde artış bulunmaktadır ($P < 0,05$) (Şekil 4.12.).



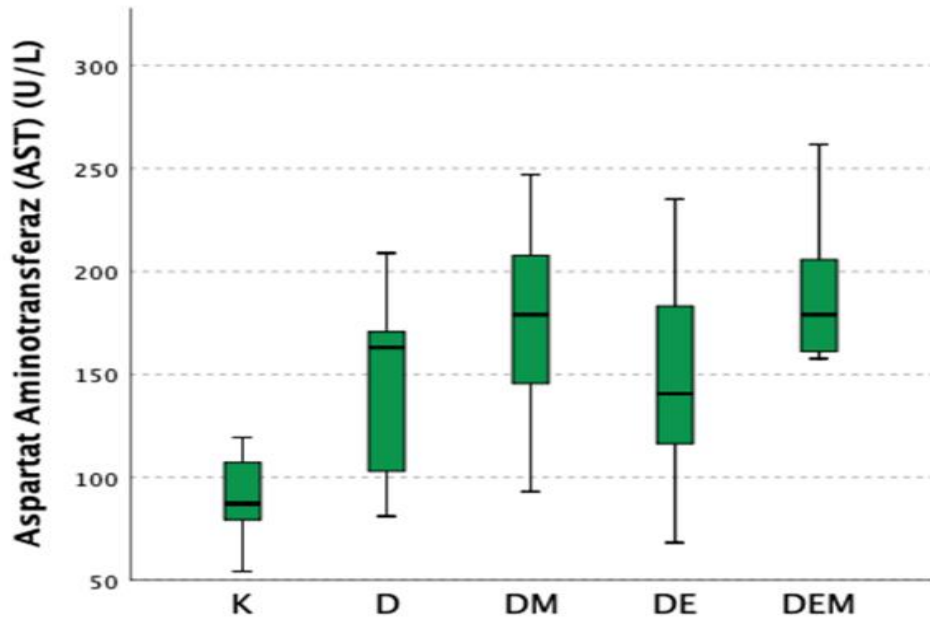
Şekil 4.12. Serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri (U/L).

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

iv. Aspartat Aminotransferaz (AST)

Serum AST analizlerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmamıştır. Ancak K grubuna göre diğer gruplarda bir yükselme gözlenmiştir (Şekil 4.13.).



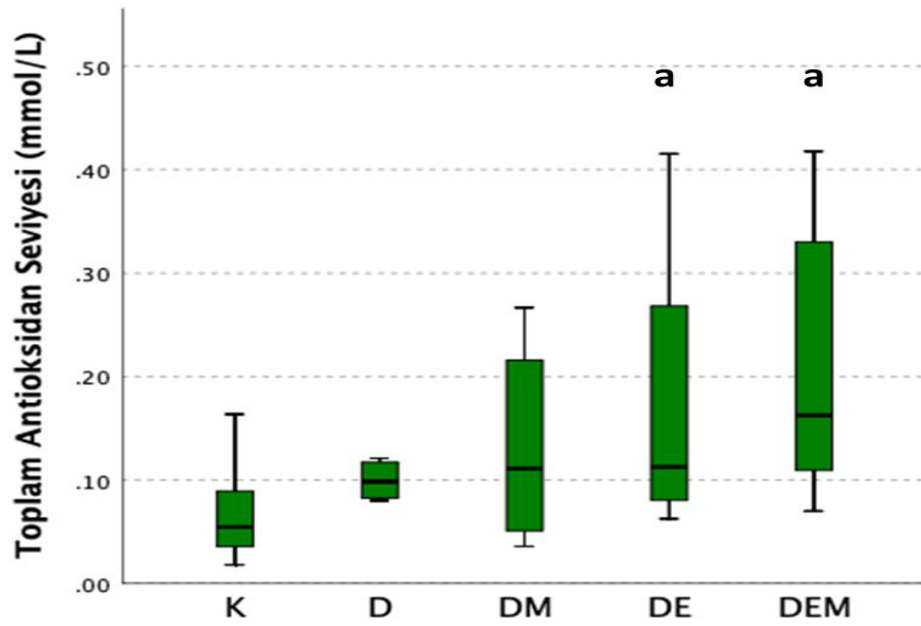
Şekil 4.13. Serum aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri (U/L).

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

4.4.2. Kas Doku Örneklerine Ait Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular

i. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)

TAS analizlerinde D grubuna göre DM, DE ve DEM gruplarında artış meydana gelmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak K grubuna göre DE ve DEM gruplarında artış bulunmaktadır ($P < 0,05$). Egzersizin antioksidan seviyeyi artırdığı ve mitokondri transplantasyonu ile birlikte daha fazla bir artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.14.).



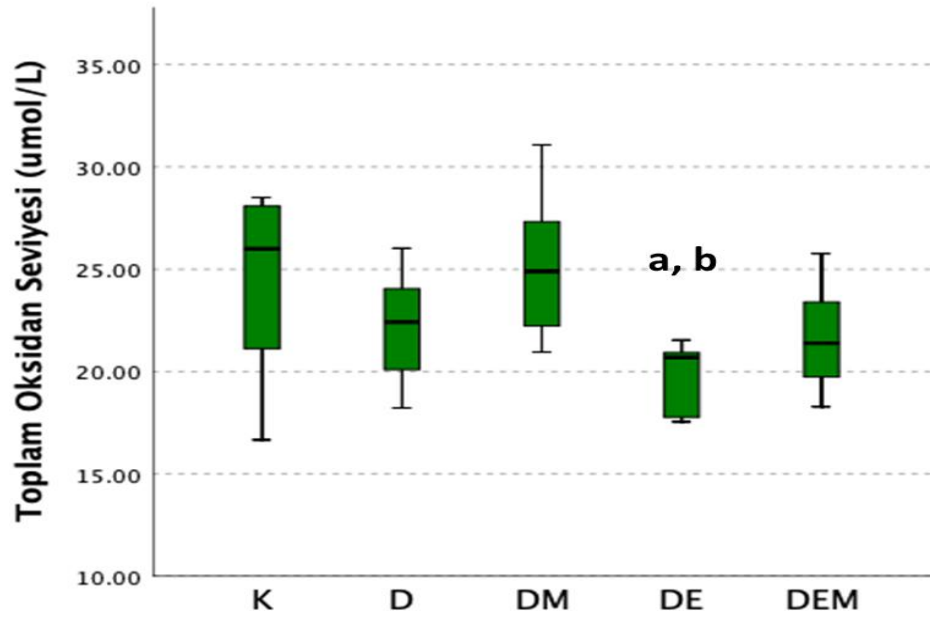
Şekil 4.14. Toplam antioksidan (TAS) seviyesi (mmol/L).

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

ii. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)

TOS analizlerinde D grubuna göre DE ve DEM gruplarında azalış meydana gelmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak K ve DM gruplarına göre DE grubunda azalış bulundu ($P < 0,05$). Egzersizin oksidan seviyeyi azalttığı açık bir şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Toplam oksidan seviyesi (TOS) (µmol/L).

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

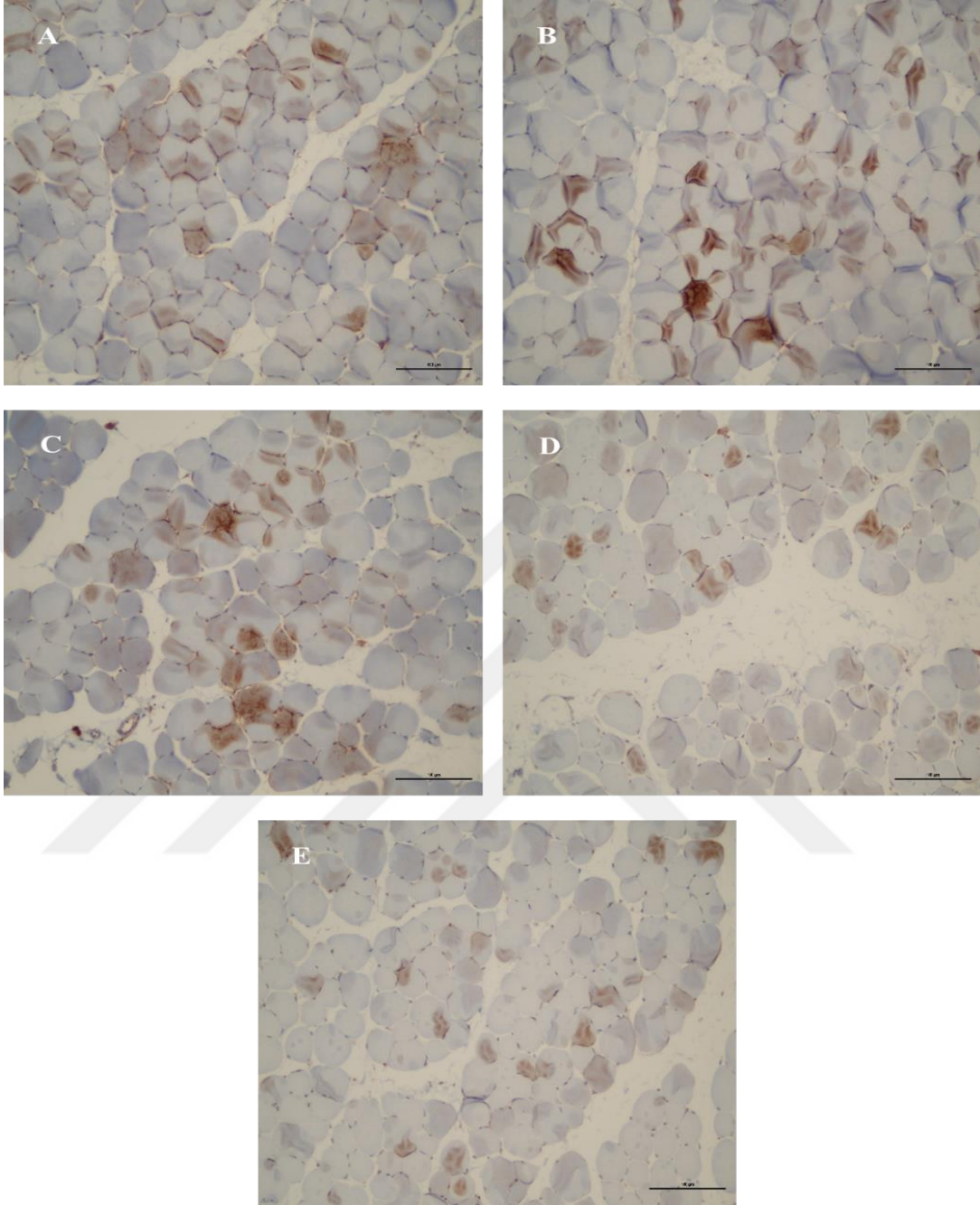
a: K grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

b: DM grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

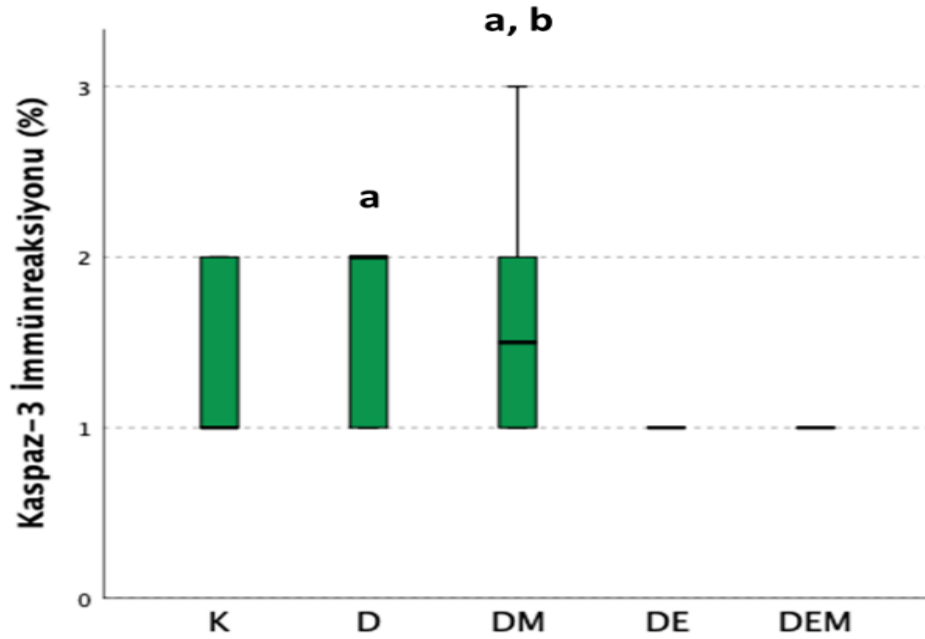
4.5. İmmünohistokimyasal Analizlerden Elde Edilen Bulgular

4.5.1. Kaspaz-3 Analizi Bulguları

Apoptoz belirteci olan kaspaz-3 analizlerinde D ve DM gruplarında DE ve DEM gruplarına kıyasla artış bulunmaktadır ($P < 0,05$). Bu durum DOX uygulamasının TA kasında meydana getirdiği apoptozu göstermektedir. Ayrıca D grubuna göre egzersiz yapan DE grubu ve hem egzersiz hem de mitokondri transplantasyonu yapılan DEM grubundaki azalışların bu grupların apoptozu önlediğini göstermektedir (Şekil 4.16.; A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu ve Şekil 4.17.).



Şekil 4.16. Kaspaz-3 görüntüleri (immünoreaksiyon). A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu (Bar: 100 µm x200 büyütme).



Şekil 4.17. Kaspaz-3 analizleri (immünoreaksiyon %).

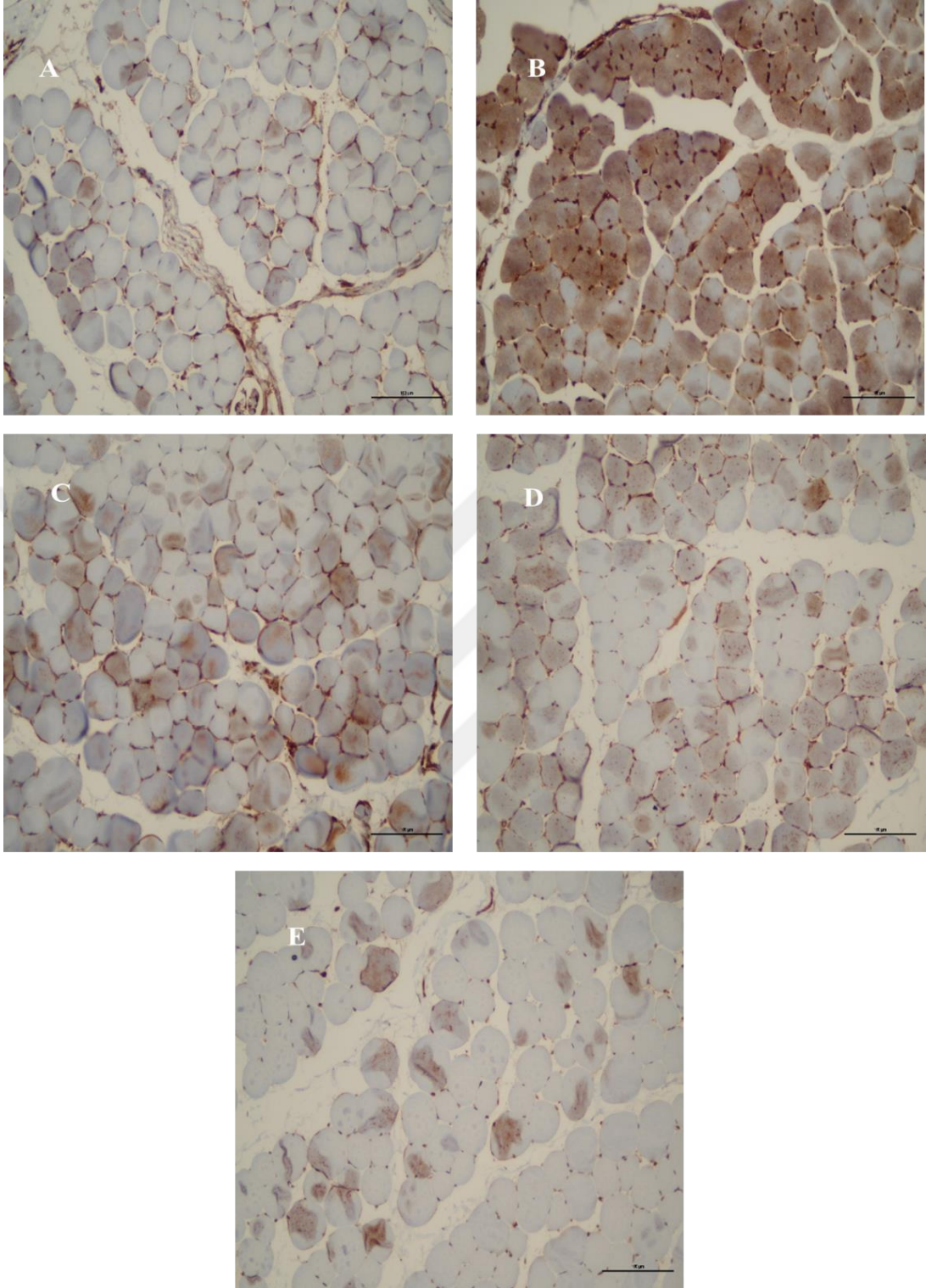
K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: DEM grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

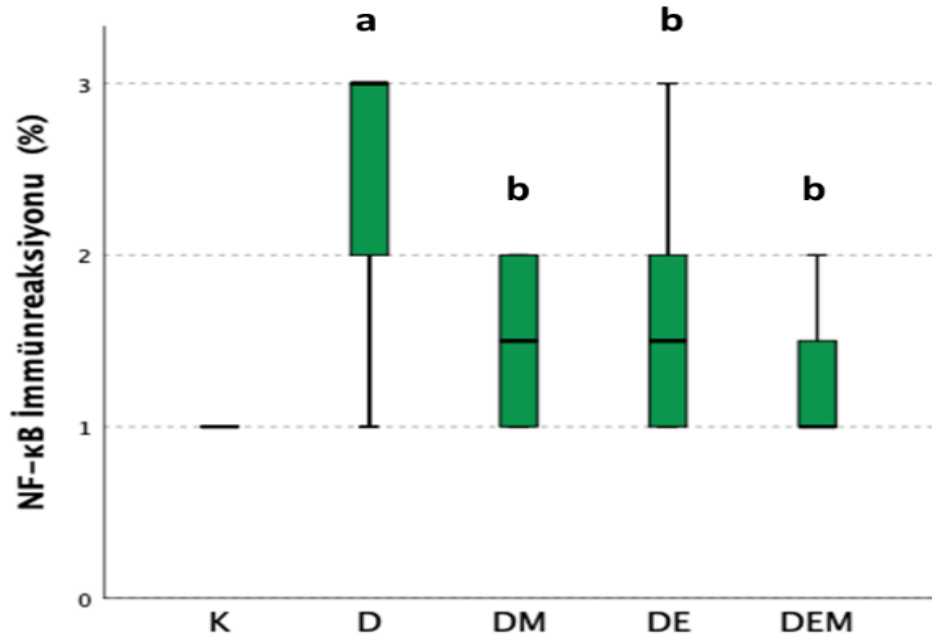
b: DE grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

4.5.2. Nükleer Faktör-Kappa B (NF- κ B) Analizi Bulguları

İnflamasyon belirteci olan NF- κ B analizlerinde K grubuna göre D grubunda artış bulunmaktadır ($P < 0,05$). Bu durum DOX uygulamasının TA kasında meydana getirdiği yoğun inflamasyonu göstermektedir. Ayrıca D grubuna göre mitokondri transplantasyonu yapılan DM grubunda ve egzersiz yapan DE grubunda ve hem egzersiz hem de mitokondri transplantasyonu yapılan DEM grubunda azalış bulunmaktadır ($P < 0,05$). Bu veriler, egzersiz ve mitokondri transplantasyonunun, DOX'un meydana getirdiği inflamasyonun önlenmesi açısından önemli olduğunu göstermektedir (Şekil 4.18.; A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu ve Şekil 4.19.).



Şekil 4.18. NF-κB görüntüleri (immunoreaksiyon) A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu (Bar: 100 μm x200 büyütme).



Şekil 4.19. NF-κB analizleri (immunoreaksiyon %).

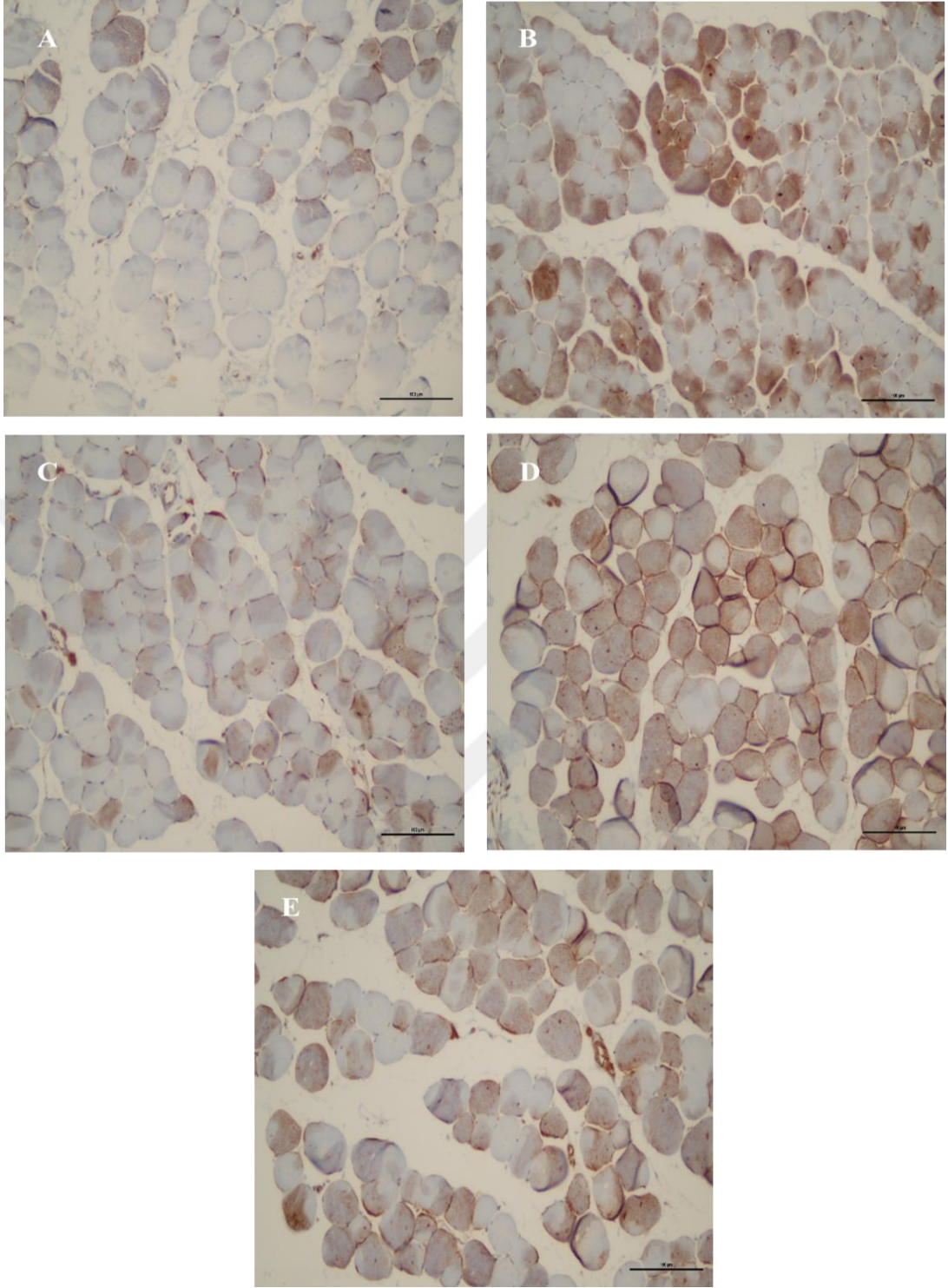
K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

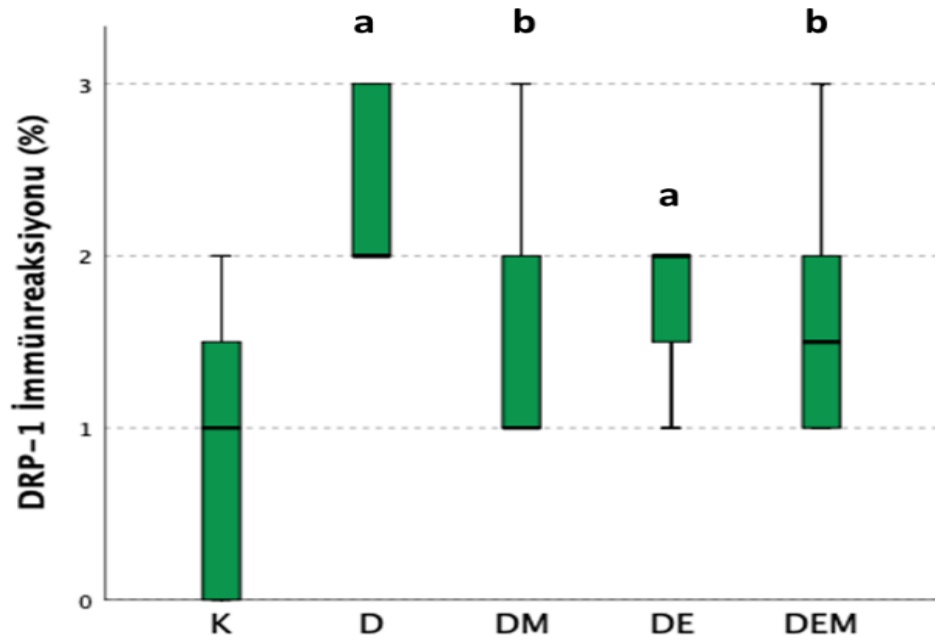
b: D grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

4.5.3. Dinamin İlişkili Protein (DRP-1) Analizi Bulguları

Mitokondri fizyon belirteci olan DRP-1 analizlerinde K grubuna göre D ve DE gruplarında artış bulunmaktadır ($P < 0,05$). Ayrıca D grubuna göre mitokondri transplantasyonu yapılan DM ve DEM gruplarında azalış bulunmaktadır ($P < 0,05$) (Şekil 4.20.; A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu ve Şekil 4.21.).



Şekil 4.20. DRP-1 görüntüleri (immünoreaksiyon) A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu (Bar: 100 µm x200 büyütme).



Şekil 4.21. DRP-1 analizleri (immünoreaksiyon %).

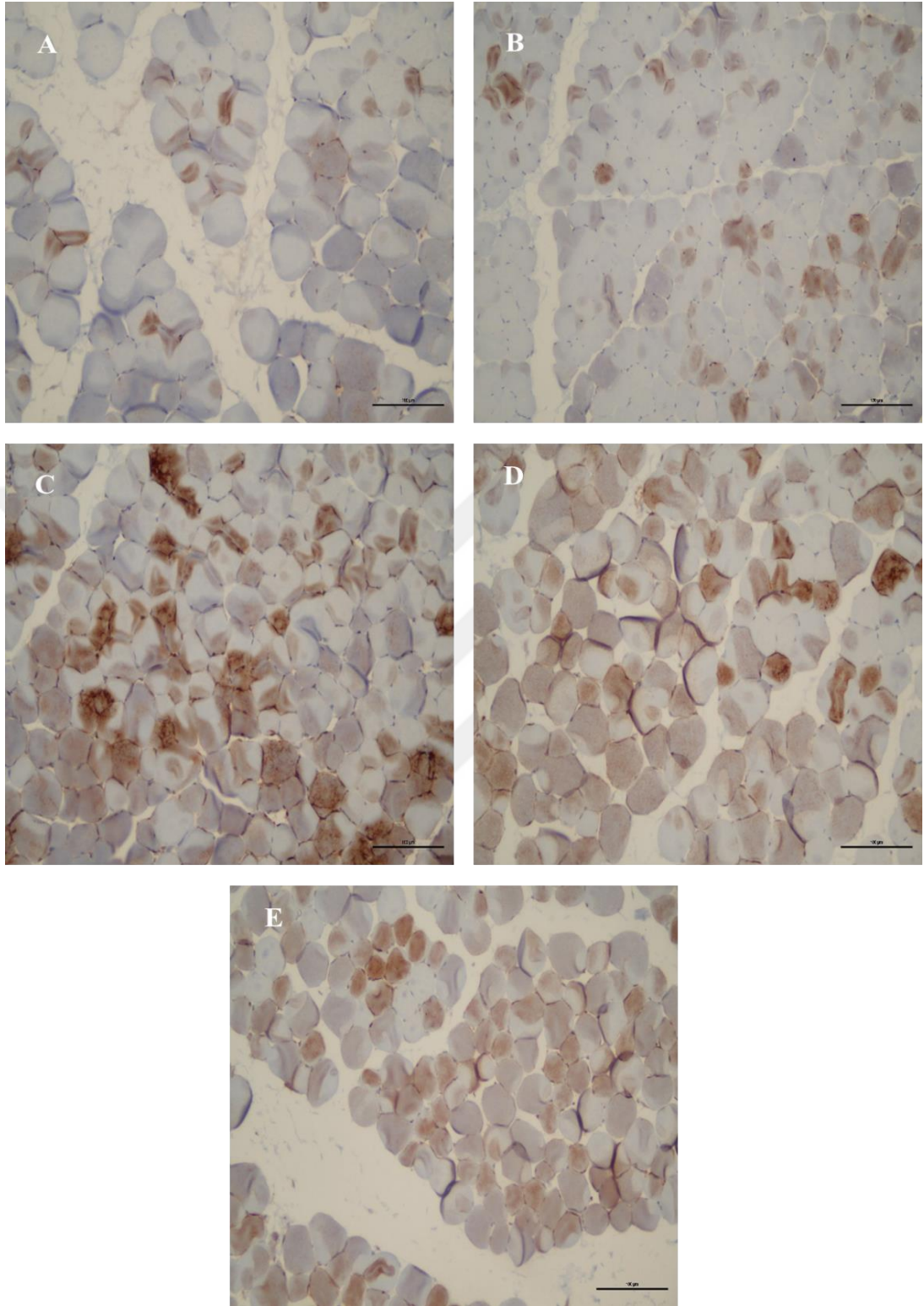
K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

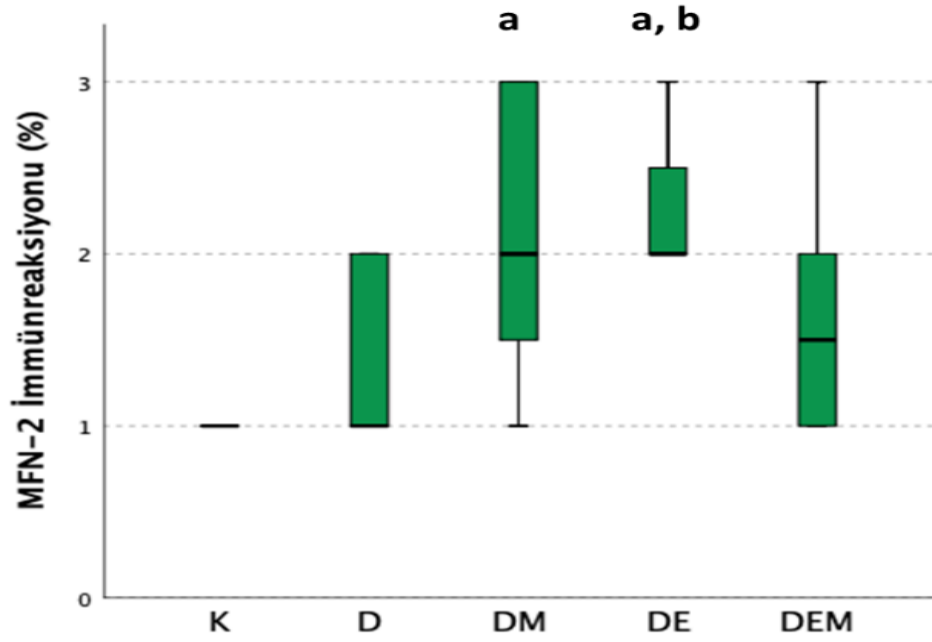
b: D grubuna göre anlamlı azalış ($P < 0,05$)

4.5.4. Mitofusin 2 (MFN-2) Analizi Bulguları

Mitokondri füzyon belirteci olan MFN-2 analizlerinde K grubuna göre DM ve DE gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış bulunmaktadır. D grubuna göre egzersiz yapan DE grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış bulunmaktadır. Ayrıca D grubuna göre mitokondri transplantasyonu yapılan DM grubuna göre anlamlılığa çok yakın bir artış olduğu görülmektedir ($P = 0,054$) (Şekil 4.22.; A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu ve Şekil 23).



Şekil 4.22. MFN-2 görüntüleri (immünoreaksiyon) A: K grubu, B: D grubu, C: DM grubu, D: DE grubu, E: DEM grubu (Bar: 100 µm x200 büyütme).



Şekil 4.23. MFN-2 analizleri (immünoreaksiyon %).

K: Kontrol grubu, D: DOX grubu, DM: DOX + Mitokondri grubu, DE: DOX + Egzersiz grubu, DEM: DOX + Egzersiz + Mitokondri grubu.

a: K grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

b: D grubuna göre anlamlı artış ($P < 0,05$)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda doksorubisin (DOX) ile oluşturulan deneysel iskelet kası atrofisi modelinde, mitokondri transplantasyonu, egzersiz ve mitokondri transplantasyonu ile egzersizin birlikte etkileri araştırıldı. Bunun için yüksek dozda DOX uygulaması ile sıçanların *tibialis anterior* (TA) kasında kas atrofisi meydana getirildi. Sunulan çalışmanın, diğer mitokondri transplantasyonu uygulanan çalışmalara göre özgünlüğü hasar oluştuktan sonra mitokondri transplantasyonu ile tedavi etmek değil, daha önce sağlıklı mitokondrileri ilgili kasa vererek DOX'un neden olacağı iskelet kası atrofisinden kası korumaktır. Ayrıca egzersizin atrofiye karşı beklenen koruyucu etkisi nedeniyle atrofi oluşturulmadan önce yaptırılmasıdır.

Mitokondri transplantasyonunun başarılı sonuçlar vermesinde izole edilen mitokondrilerin kalite kontrol analizleri ve transfer edilecek mitokondrilerin dozunun belirlenmesi önemlidir. Bununla ilgili olarak sunulan tez çalışmasında mitokondri membran bütünlüğü, mitokondri membran potansiyeli ve mitokondriyal protein düzeyi değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen veriler, mitokondri transplantasyonunun tek başına kas atrofisinin önlenmesi ile kas lifi enine kesit alanının korunmasında rol oynamadığını fakat mitokondri enzimlerinde, mitokondriyal dinamiklerde ve inflamasyonu önlemede etkin olduğunu göstermiştir. Egzersizin, kas lifi enine kesit alanının korunmasında, mitokondriyal parametlerde ve inflamasyonda etkin olduğu gösterilmiştir. Egzersiz ve mitokondri transplantasyonu birlikte uygulandığında ise kas atrofisinin önlenmesinde daha etkili olmuştur.

5.1. İzole Mitokondrilerin Kalite Kontrol Analizleri

Tez çalışmasında, mitokondri transplantasyonu için *biceps femoris* kasından alınan doku örneğinden mitokondri izolasyonu yapılmıştır. Mitokondri izolasyonu öncesi kas dokusu örneklerinde *MitoTracker Red CMXRos* boyaması ile izole edilecek mitokondrilerin membran bütünlüğünü koruduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada izole mitokondrilerin aktif ve sağlam olduğunu belirlemek için mitokondri kalite kontrol analizleri yapılmıştır. McCully ve ark. iskemik kalp modelinde mitokondri

transplantasyonunun etkilerini araştırmak için sol ventrikül dokusundan izole ettikleri mitokondrileri kullanmışlar ve bu mitokondrilerin membran bütünlüğünü *MitoTracker Orange CMTMROS* ve zıt boyama için *MitoFluor Green* (MTG) boyaması ile göstermiştir (216). *Mito Tracker Red CMXRos*, negatif mitokondriyal membran potansiyelleri (MMP) ile mitokondri içinde biriken lipofilik katyonik bir floresan boya olmasına rağmen MTG floresansı, MMP'den bağımsız olarak mitokondriyal kütlenin bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır (217, 218). Bu kapsamda çalışmamızda izole edilen mitokondrilerin membran bütünlüğü *MitoTracker Red CMXRos* ve *MitoSpy Green FM* boya ile boyanarak floresan mikroskopta gösterilmiştir.

JC-1 boyası, mitokondriye girebilen ve konsantrasyona bağlı bir şekilde J agregatları adı verilen kompleksler oluşturmaya başlayan lipofilik, katyonik bir boyadır (213, 219). Proton pompaları (Kompleks I, III ve IV) tarafından üretilen mitokondriyal membran potansiyeli, oksidatif fosforilasyon sırasında enerji depolama sürecinde önemli bir bileşendir (220). Bir çalışmada mezenkimal kök hücrelerden (MKH) izole edilen mitokondrilerin membran potansiyeli JC-1 boyaması ile gösterilmiştir. İzole mitokondrilerde kırmızı renk yoğunluğu yüksek zar potansiyelini, kalitesini ve transplantasyon için uygunluklarını göstermiştir (190). Yine başka bir çalışmada, Shi ve ark. insan karaciğer kanseri hücre hattı olan HepG2 hücrelerinden izole ettikleri mitokondrilerde JC-1 ile membran potansiyelini incelemişler ve mitokondri membran potansiyeli normal olduğu için yoğun kırmızı floresan ışması gözlemlemişlerdir (221). Sunulan çalışmada, mitokondrilerin *intakt* yani membran potansiyelini sürdürüp sürdürmediğini analiz etmek için JC-1 boyaması yapıldı, hemen floresan mikroskopta incelenmiştir ve görüldü ki izole edilen mitokondriler membran potansiyelini sürdürmekteydi. Mitokondri transplantasyonu yapılmadan önce hedef dokuya verilecek mitokondrilerin dozunun ayarlanması büyük önem arz etmektedir. Mitokondri dozunu ayarlamak ve ölçmek için hemositometre, partikül sayıcı ve mitokondriyal protein ölçümü gibi yöntemler kullanılmaktadır (144). Zhao ve ark. yaşlı farelerde bilişsel ve motor fonksiyonları geliştirmek için mitokondri transplantasyonu gerçekleştirmişler ve bu farelere verilecek dozu 5 mg/kg mitokondriyal protein olarak belirlemişlerdir (222). Lee ve ark. tendinopati modelinde mitokondri

transplantasyonu için MKH'den izole edilmiş mitokondrilerin dozunu BCA protein analizi ile 10 ve 50 µg/20 µl olarak belirlemişlerdir (223). Bu çalışmada, mitokondri transplantasyonu yapılacak gruplara verilecek doz ve mitokondriyal protein düzeyini belirlemek için izole mitokondrilerin protein içeriği BCA protein analiz kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Bunun sonucunda her bir sıçanın her bir TA kasına verilecek dozun 6,5 µg/100 µl olmasına karar verilmiştir.

5.2. DOX'un İskelet Kası Üzerindeki Etkisi

DOX uygulaması yapılan sıçanlar incelendiğinde tedavi grupları ile kıyaslandığında TA kası kütlesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Vücut ağırlıkları açısından ise yine tedavi gruplarına göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Bir çalışmada, kronik DOX tedavisi sonucunda vücut ağırlığında ve *gastrocnemius* kas kütlesinde azalma olduğu raporlanmıştır (7). Başka bir çalışmada ise, tek başına tümöre veya DOX'a maruz kalma, *soleus* kas kütlesinde yaklaşık %13-16'lık bir azalmaya neden olmuştur. Kanser kemoterapisinin birleşik etkisi ile farelerin *soleus* kası ağırlığında ve enine kesit alanında benzer bir azalma ortaya çıkmıştır (47).

Tez çalışmasında DOX'un iskelet kas atrofisine neden olduğu elde edilen çeşitli verilerle gösterilmiştir. Bu kapsamda DOX TA kası enine kesit alanında kontrol grubu ile kıyaslandığında azalmaya ($P < 0,05$) neden olmuş olup bu veri kas atrofisinin primer bulgusu olarak değerlendirilmiştir. Nitekim bu enine kesit alanındaki azalma incelenen mevcut literatür ile korelasyon göstermiştir. Şöyle ki, sakrifikasyondan 48 saat önce uygulanan DOX (20 mg/kg) enjeksiyonu, diyafram, *soleus* ve *plantaris* kaslarında lif çapında önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır. Aynı çalışmada DOX ile tedavi, diyafram, *plantaris* ve *soleus* kaslarında tip I, tip IIa ve tip IIx/b'de kas lifi çapında önemli bir azalma göstermiştir (39). Başka bir çalışmada, DOX uygulamasının, kontrolleri ile karşılaştırıldığında kas lifi çapını %17 oranında önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır (42). Başka bir çalışmada ise yine, tek doz DOX (15 mg/kg) uygulaması ile EDL kasının enine kesit alanında bir azalma meydana gelmiştir (17).

DOX uygulaması ile oluşturulan karaciğer toksisitesi modelinde TAS seviyeleri azalmış ve TOS seviyeleri karaciğer dokusunda artmıştır (224). Başka bir çalışmada ise

DOX ile oluşturulan miyokart hasarında TAS seviyelerinin azaldığı ve TOS seviyelerinin kalp dokusunda arttığı gösterilmiştir (225). Çalışmamızda kas dokusu örneklerinde D grubunda TAS seviyeleri diğer tedavi gruplarına göre azalmış ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Kas dokusu TOS seviyelerinde ise D grubu DE ve DEM gruplarına yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır.

DOX uygulaması, kas atrofisi nedeniyle mitokondriyal enzim parametrelerinde de azalışa neden olmuştur. DOX'un SDH aktivitesini azalttığını gösteren bir çalışmada izole edilmiş kalp mitokondrisine 3.5 μ M DOX uygulaması SDH aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (226). DOX ile tedavi edilen hastalarda, kontrollere kıyasla kalp kasında SDH aktivite oranında azalma görülmüştür (227) Campejl ve ark. DOX ile oluşturulan kaşeksi modelinde TA kaslarında DOX'un neden olduğu SDH enzim aktivitesi azalışını raporlamışlardır (228). Çalışmamızda SDH analizi yapılmıştır ve elde edilen verilere göre DOX verilen grupta (D) diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulunmuştur ($P < 0,05$).

Kaspaz-3, kas atrofisi sırasında kas proteini sentezinin bozulmasında önemli bir rol oynamaktadır (229). Daha da önemlisi, kaspaz-3'ün ROT tarafından da aktive edilebileceğini ve DOX uygulamasının kardiyomiyositlerde kaspaz-3 aktivasyonunu desteklediği gösterilmiştir (230). Smuder ve ark. DOX ile tedavi edilen hayvanların iskelet kasında oksidatif stresin ve hücrel proteazların (kalpain ve kaspaz-3) aktivasyonunun arttığını bildirmiştir (19). Bu çalışmada ise apoptoz belirteçlerinden olan kaspaz-3 analizi verilerinde DOX'un etkisi ile kontrol, DE ve DEM gruplarına göre D grubunda artış olmuş ama DE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur ($P < 0,05$).

Mitokondriyal dinamiklerin (DRP-1, MFN-2 gibi) DOX uygulaması ile etkilendiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bir çalışmada erkek F344 farelerine 20 mg/kg DOX enjekte edilmiş ve DRP-1 protein içeriğini artırdığı bulunmuştur (231). DOX uygulaması sonrası kalpte DRP-1 Ser616 fosforilasyon seviyelerinin arttığı da öne sürülmüştür (232).

MFN-2 ifadesi, mitokondriyal biyogeneze yer alan genlerin ifadesi ve belli antioksidan sistemler için de gerekli olan östrojenle ilişkili reseptör α (ERR α) ile birlikte

PGC-1 α ko-aktivasyonu tarafından yönlendirilir (233). DOX ile birlikte iskelet kasında MFN-2 protein seviyelerinin arttığı gösterilmesine rağmen bazı çalışmalarda bu seviyenin azaldığı ya da hiçbir değişiklik göstermediği rapor edilmiştir. Çalışmamızda, mitokondriyal fizyon analizlerinden DRP-1 analizi bulguları da D grubunda artmış olup ($P < 0,05$), mitokondriyal füzyon analizi MFN-2 ise kontrol grubu ile aynı seviyede kalmıştır.

NF- κ B aktivasyonu, DOX ile tedavi edilen endotel hücrelerinde ve kardiyomiyositlerde pro-apoptotik etki göstermiştir (234). Bir çalışmada ise iskelet kasında DOX'un NF- κ B aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir (235). DOX mitokondriyal ROT'a bağımlı ve P38 MAPK yolları aracılığıyla NF- κ B aktivasyonunu uyarmıştır (236). Bu çalışmada inflamasyon açısından TA kaslarına NF- κ B ifade analizi yapılmıştır. Bu analizden elde edilen bulgularda, D grubundaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık gösterilmiştir ($P < 0,05$).

5.3. İskelet Kası Atrofisinde Mitokondri Transplantasyonunun Etkisi

Mitokondri transplantasyonu, çeşitli hastalıkların tedavisi için son yıllarda umut verici bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemin, insan klinik deneylerinde kardiyak iskemi-reperfüzyon tedavisi için yararlı olduğu bildirilmiştir (237) ve ayrıca mitokondriyal işlev bozukluğuna bağlı kalp, böbrek, karaciğer, akciğerler, yaşlanma ve beyin hastalıklarını tedavi edici etkisi prelinik çalışmalarda da gösterilmiştir (195, 198, 238-240). İskelet kasında mitokondri transplantasyonu etkileri ile ilgili çok az sayıda araştırma bulunmasına rağmen bu az sayıdaki araştırmaların sonuçları iskelet kası atrofisi ve hasarında muhtemel tedavi olarak gösterilmesine yol açmıştır. Son yıllarda birçok çalışma ile, ekzojen mitokondrilerin direkt sistemik enjeksiyon ve intranazal olarak *in vivo* ve ko-inkübasyon gibi *in vitro* yöntemlerle hedef doku ya da hücrelere biyodağılımı gösterilmiştir (143).

Alway ve ark. iskelet kası hasarı modelinde, mitokondri transplantasyonu ile farelerde sistemik inflamasyonun artmadığını göstermiştir. Ek olarak, hasardan 7 gün sonra mitokondri transplantasyonu ile kas kütlesi azalmamış ve kas kesitlerindeki kollajen ve diğer kasılmayan doku yüzdesi daha düşük bulunmuştur. Kas ağırlığı ve

maksimal kas kuvveti, hasardan 14 gün sonra kontrol seviyelerine geri dönmüştür (24). Kim ve ark., deksametazon ile oluşturulan kas atrofisinde mitokondri transplantasyonu ile kas kütlesinde 1,5 kat artışın olduğunu göstermişlerdir (25). Çalışmamızda, DOX uygulaması ve mitokondri transplantasyonu yapılan sıçanlar incelendiğinde kontrol grubu ile kıyaslandığında TA kas kütlesinde artış meydana gelmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Fakat mitokondri transplantasyonu yapılan bu sıçanların son vücut ağırlıkları kontrol ve D grubuna göre artmış olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$).

Deksametazon yoluyla oluşturulan iskelet kası atrofisinde mitokondri transplantasyonunun etkileri *in vivo* ve *in vitro* incelenmiştir. L6 hücrelerinde 1 μ M deksametazon ile kas atrofisi indüklenmiş ve bu hücrelere izole mitokondrinin transplantasyonu atrofik kas hücrelerinde kas atrofisinin altında yatan *AMPK/FoxO3/Atrogene* yolunu bloke etmiştir (241). Tez çalışmasında DOX'un iskelet kas atrofisine neden olduğu çeşitli parametrelerde gösterilmiş olup mitokondri transplantasyonunun bu kas atrofisini engelleyip engellemeyeceği araştırılmıştır. Bu kapsamda DOX, TA kası enine kesit alanında azalmaya neden olmuş ama mitokondri transplantasyonu ile kas lifi enine kesit alanı artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Ülger ve ark. karaciğer toksisitesi modelinde mitokondri transplantasyonunun etkilerini araştırmışlar ve oksidan-antioksidan parametrelerini incelemişlerdir. Mitokondri transplantasyonu ile TOS seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir (198). Çalışmamızda DM grubunda TAS seviyelerinin K ve D grubuna göre arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. TOS seviyelerinin ise K grubu ile aynı düzeylerde kaldığı gösterilmiştir.

Beyin iskemi-reperfüzyon hasarında ekzojen mitokondri transplantasyonunun apoptotik hücre sayısını ve kaspaz-3 seviyelerini azalttığı bulunmuştur (242). Mitofusin proteinleri, ekzojen ve endojen mitokondrilerin füzyona uğradığı bölgelerde yoğunlaşır ve MFN-1 ve MFN-2 mitokondri transplantasyonu ile artış gösterir (243). Bir kardiyak *arest* modelinde ise DRP-1 seviyelerinin arttığı, ekzojen mitokondri transplantasyonu ile bu seviyenin azaldığı görülmüştür (238). Mitokondri

transferinden 48 saat sonra atrofik hücrelerde, AMPK aktivasyonu ve PGC-1a ifadesi, hücre içi ATP içeriği ile tutarlı olarak doza bağlı bir şekilde normal seviyelere dönmüştür (241). Sunulan tez çalışmasında, TA kası atrofisi nedeniyle mitokondriyal enzim parametrelerinden SDH analizinde D grubuna göre mitokondri transplantasyonu yapılan DM grubunda anlamlı artış bulunmuştur ($P < 0,05$). Apoptoz belirteçlerinden olan kaspaz-3 bulgularında DE ve DEM gruplarına göre mitokondri transplantasyonu yapılan DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış gösterilmiştir ($P < 0,05$). Bunun sebebi ise mitokondri transplantasyonunun bir *re-modeling* yaparak apoptoz ile indüklenmiş proliferasyon ile yükselmiş olduğu düşünülmüştür (244). Mevcut literatür ile kıyaslandığında ise çalışmamızda iki doz ve iki günlük bir bekleme süresi olması bu artıştan sorumlu olabileceği olarak yorumlanmıştır. Çünkü iskelet kası atrofisi ve iskelet kası hasarı çalışmalarında sürenin daha uzun olduğu gösterilmiştir (24, 25). Mitokondriyal fizyon analizlerinden DRP-1 analizi bulguları da gösteriyor ki D grubunda artmış olan bu parametre mitokondri transplantasyonu yapılan DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($P < 0,05$). Mitokondriyal füzyon analizi MFN-2 bulgularında ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış bulunmuştur ve D grubuna göre de artış olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır.

Mitokondriyal işlev bozukluğu, kontrolsüz ROT salınımı ve NF- κ B aktivasyonu yoluyla inflamasyonun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (245). Tendinopati modelinde mitokondri transplantasyonu, doku inflamasyonunun önemli bir düzenleyicisi olan NF- κ B seviyesindeki hasara bağlı artışı ve proinflamatuvar belirteç (IL-1 β ve IL-6) seviyeleri ile birlikte NF- κ B sinyal yolağını baskıladığı gözlenmiştir (223). Çalışmamızda, DM grubunda inflamasyon parametrelerinden NF- κ B ifadesi incelendiğinde TA kaslarında inflamasyonun azaldığı gösterilmiştir ($P < 0,05$).

5.4. İskelet Kası Atrofisinde Egzersizin Etkisi

İskelet kaslarını görevi sadece hareket değil, aynı zamanda vücutta glikoz metabolizmasını ve patolojik durumlarda diğer organlar için yakıt deposunu düzenlediği gözlenmiştir (70). İskelet kası atrofisi, hareketsizlik/kullanılmama gibi

katabolik hastalıklar nedeniyle net protein, organel ve sitoplazma kaybından kaynaklanmaktadır (71). İlk defa 1979'da, egzersizin DOX'un meydana getirdiği toksik etkilere karşı terapötik etkiler ortaya çıkardığı raporlanmıştır (134).

Bu çalışmada DOX ile meydana gelen iskelet kas atrofisinde koşu bandı egzersizinin etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda DOX uygulaması yapılmadan önce sıçanlar koşu bandı egzersizine tabi tutulmuştur. Bir çalışmada, insanlarda 14 günlük tek bacak immobilizasyonu sırasındaki direnç egzersizinin, *kuadriseps* kas kütleini korumak için yeterli olduğu gösterilmiştir (116). DOX uygulaması ve egzersiz yaptırılan sıçanların TA kas kütleini incelendiğinde DOX tedavisi ile yapılan aerobik egzersiz, kas kütleini, lif enine kesit alanını, maksimum aerobik kapasiteyi artırmış ve kas yorgunluğunu azaltmıştır. Bu DOX'un kas performansı ve biyoenerjetik üzerindeki olumsuz etkilerini baskılayarak AMPK aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (7). Bu çalışmada ise TA kas kütleinde kontrol grubuna göre DE grubunda artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). Bununla birlikte egzersiz yapan bu gruptaki sıçanlarda TA kas kütleini D ve DM gruplarına göre daha fazla kas kütleine olup istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Son vücut ağırlıkları ise hem kontrol hem de D grubuna göre artmıştır ($P < 0,05$). Bu grupta yine TA kası-mg/SVA-gr oranı açısından da kontrol ve DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ($P < 0,05$). Ayrıca D grubuna göre DE grubunda anlamlılığa çok yakın bir artış gözlemlenmiştir ($P = 0,052$). Egzersizin koruyucu etkisi ile TA kasının enine kesit alanında artış meydana gelmiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu gösterilmiştir ($P < 0,05$).

Berzosa ve ark. egzersiz yapan ve yapmayan bireylerde antioksidan durumları incelemişler ve egzersizin TAS seviyelerini artırdığını bulmuşlardır (246). TAS seviyeleri dinlenimden egzersiz sonrası döneme kadar önemli ölçüde yükselmiş ve 24 saat boyunca egzersiz öncesi seviyelerin üzerinde kalmıştır (247). Kocabaş ve ark. voleybol oyuncularında aralıklı egzersizin oksidan ve antioksidan parametreleri üzerine etkisini incelemişler ve voleybol maçı sonrasında TOS seviyelerinin düşük olduğunu göstermişlerdir (248). Çalışmamızda TAS seviyeleri DE grubunda K grubuna

göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış bulunmuştur ($P < 0,05$). TOS seviyeleri ise yine DE grubunda hem K hem de DM grubuna azalış meydana gelmiştir ($P < 0,05$).

Bir çalışmada egzersiz ve DOX birlikte kullanılması önemli ölçüde mitokondriyal enzim olan sitrat sentaz seviyelerini artırmış ve bu egzersizin mitokondriyal biyogenezi uyurabileceğini düşündürmüştür (48, 249). Çalışmamızda, egzersiz mitokondriyal enzim parametresi SDH artışına neden olmuştur ($P < 0,05$).

Son çalışmalar, 85 gün yatak istirahati sırasında eşzamanlı egzersizin, genç erkeklerin *vastus lateralis* kasındaki mitokondriyal fonksiyonu ve oksidatif metabolizmayı normalleştirdiğini göstermiştir (125). Mitokondriyal biyogenezin ana düzenleyicisi olarak bilinen PGC1 α ifadesinin, atrofik koşullar altında *gastroknemius* kasında önemli ölçüde azaldığı ve genetik manipülasyon yolu ile indüklenen PGC1 α 'nın ifadesinin artışı, FoxO3'ü baskılayarak *tibialis anterior* kasındaki tip II lif atrofisini azalttığı bulunmuştur (138). Egzersizle birlikte kalpteki kaspaz-3 aktivitesi, DOX tedavisinden sonra yükselmemiştir (250). İskelet kası lifleri, kalpain ve kaspaz-3 gibi proteaz ağları içermektedir (251). Egzersiz, iskelet kasında kalpain ve kaspaz-3'ün DOX kaynaklı aktivasyonunu azaltmıştır (19). Song ve ark. aerobik egzersizin sıçanların baldır kasında ve *soleus* kasında kaspaz-3 aktivitesini, Bax ve Bax/Bcl2 oranını düşürürken Bcl-2 düzeylerini artırdığını belirtmiştir (252). DRP-1 ifadesinin tip 2 diyabetik farelerde kas insülin direncine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (253). DOX uygulaması yapılan hayvanlarda egzersizle kalp ve *soleus* kaslarındaki MFN-2 protein seviyesi değişmemiştir (20). DRP-1, MFN-2 ve PGC-1 α ifadeleri, egzersizin 45. dakikasında ve toparlanma döneminde *gastroknemius* kasında önemli ölçüde artmıştır (254). Çalışmamızda, kaspaz-3 analizi bulgularında ise DE grubu kontrol düzeylerinde olup bu düzey istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Mitokondriyal fizyon parametresi olan DRP-1 analizi bulgularında ise DE grubunda DRP-1 ifadesi istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Mitokondriyal füzyon analizi MFN-2 bulgularında ise kontrol grubuna göre ve D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış bulunmuştur ($P < 0,05$).

Vella ve ark. normal insan iskelet kasında fosfo-NF- κ B (p65) protein seviyelerinin egzersizden 2 saat sonra arttığını ve egzersizden 4 saat sonra bazal seviyelere geri

döndüğünü göstermiştir (255). Başka bir çalışmada Liu ve ark. diyabetik farelere uygulanan egzersizin, I κ Ba/NF- κ B yolağının aktivasyonunun azaldığını rapor etmiştir (256). Bu çalışmada ise egzersizin etkisiyle DE grubunda da inflamasyon parametrelerinden NF- κ B ifadesi TA kaslarında azalmıştır ($P < 0,05$).

5.5. İskelet Kası Atrofisinde Egzersiz ve Mitokondri Transplantasyonunun Birlikte Etkisi

Birkaç çalışmada DOX uygulaması vücut ağırlığında önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır (14, 46). Başka bir çalışmada ise vücut ağırlığındaki azalmaya iskelet kası ağırlığındaki azalma da eşlik etmiştir (8). Azalan iskelet kası ağırlığına paralel olarak, DOX ile azalmış bir kas lifi enine kesit alanı olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (59). Bununla birlikte hem egzersizin hem de mitokondri transplantasyonunun tek başlarına kas ağırlığında ve kas lifi enine kesit alanında artışa yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (24, 25, 257). Deksametazon ile oluşturulan *soleus* kası atrofisinde her bir kasa 0,5 ve 5 μ g dozlarda verilen mitokondri kas kütlelerini ve kas enine kesit alanını artırmıştır (25). Dickinson ve ark. total 12 mg/kg DOX uygulanan hayvanlara uyguladıkları koşu bandı egzersizi ile hem tip 1 hem de tip 2 kasların enine kesit alanlarında artış olduğunu göstermişlerdir (136). Çalışmamızda, DOX uygulaması ile meydana gelen kas atrofisini önlemek için DEM grubundaki sıçanlara hem egzersiz hem de mitokondri transplantasyonu yapılmıştır. Bu gruptaki sıçanlarda TA kas ağırlığı diğer bütün gruplara göre artış göstermiştir ($P < 0,05$). Ayrıca son vücut ağırlığı D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). TA kası-mg/SVA-gr oranında da artış meydana gelmiş ancak bu artış sadece mitokondri transplantasyonu yapılan DM grubu ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu çalışmada DOX'un iskelet kası atrofisine neden olduğu gösterilmiş olup mitokondri transplantasyonuna ek olarak bu gruptaki sıçanlara egzersiz yaptırılmıştır. Bu kapsamda kas atrofisini engelleyen en iyi grup olarak DEM grubu gösterilmiştir. TA kası enine kesit alanında meydana gelen bu artış hem D hem de DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$).

Egzersiz ve mitokondri transplantasyonunun TAS ve TOS seviyeleri üzerindeki olumlu etkileri ayrı ayrı çalışmalarda gösterilmiştir (198, 258, 259). Hem egzersiz hem de mitokondri transplantasyonunun birlikte etkisini gösteren çalışma yapılmamış olup bizim çalışmamızda birlikte etkileri incelenmiştir. Buna göre TOS seviyeleri DEM grubunda K, D ve DM gruplarına göre düşük bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. TAS seviyeleri ise DEM grubunda diğer tüm gruplara göre en yüksek grup olup K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$).

Mitokondri hedefli bir antioksidan (SS31) ile tedavi, mitokondriyal ROT'u, oksidatif stresi, proteaz aktivasyonunu ve kas lifindeki atrofiyi önlemiştir (260). DOX uygulamasından önce yapılan egzersiz etkili bir stratejidir. Tek bir DOX dozundan kaynaklanan akut toksisiteye karşı koymak için (10-20 mg/kg), egzersiz oksidatif hasarı, artmış apoptotik sinyalleşmeyi ve değişmiş mitokondriyal biyogenezi düzeltebilir (20, 261, 262). Mitokondriyal oksidatif kompleks I enzimleri mitokondriyal transplantasyondan 7 gün sonra, doza bağımlı bir şekilde artmıştır (25). Başka bir çalışmada ise, miyokart iskemisi hasarında kardiyomiyositlerin genel oksidatif kompleks enzimleri önemli ölçüde azalmış olup bu azalma kısmen mitokondriyal transplantasyon ile düzelmiştir. Aynı çalışmada transplantasyon yapılmayan farelere kıyasla, kaspaz-3 ifadesinde 2,3 kat azalma ve Bax/Bcl-2 oranında 2,2 kat azalma gösterilmiştir (204). İskelet kasındaki mitokondriyal füzyon ve fizyon proteinlerinin gen ifadesi, oksidatif fosforilasyonun etkinliğini önemli ölçüde etkileyebilecek uzun süreli egzersiz sırasında artan metabolik talebe hızla yanıt verebilir (263). Mitokondriyal füzyonun tetiklenmesi için egzersiz grubunda MFN-2 ve Optik atrofi-1 (OPA-1) ifade seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir, oysa mitokondriyal fizyon protein ifade seviyelerinin fiziksel aktivite grubunda değişmediği gösterilmiş olup bunun da mitokondriyal füzyona geçişin olduğunu düşündürmüştür (264). Çalışmamızda, DEM grubu mitokondriyal enzim parametresi olan SDH düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür ($P < 0,05$). Apoptoz belirteçlerinden olan kaspaz-3 analizi bulgularında DEM grubu kontrol grubu seviyelerinde bulunmuş ancak bu seviye istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Mitokondriyal fizyonun belirteci olan

DRP-1 analizinde ise yine mitokondri transplantasyonu yapılan DM grubu gibi DEM grubunda da istatistiksel olarak anlamlı azalış meydana gelmiştir ($P < 0,05$). Mitokondriyal füzyon belirteci olan MFN-2 bulgularında ise DEM grubunda hem kontrol hem de D grubuna göre artış meydana gelmiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

NF- κ B sinyal yolağı ile ROT üretimi arasında bir ilişkinin olduğu bildirilmiş ve bazı NF- κ B tarafından düzenlenen genler, hücredeki ROT miktarını düzenlemede önemli bir rol oynarken, ROT'un NF- κ B sinyalleşmesinde çeşitli inhibe edici veya uyarıcı rolleri vardır (265). Mokthari ve ark. mitokondriyal transplantasyonun mitokondriyal işlevi ve mitokondriyal biyogenez ve füzyon genlerinin ifadesini eski haline getirdiğini ve mitokondriyal füzyon geninin ifadesini ve inflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin azaldığını rapor etmiştir (266). Mitokondriyal transplantasyon sistemik inflamasyonu azaltarak organ hasarı ile ilişkili olan septik farelerin hayatta kalma oranını artırmıştır (267). Transplante edilen mitokondri, doku oksidatif ve inflamatuvar sinyalini azaltarak akciğer fonksiyonunu iyileştirmiştir (268). Çalışmamızda, mitokondri transplantasyonu ve egzersizin yapıldığı bu DEM grubunda inflamasyon açısından NF- κ B ifadesi en fazla azalmış olup bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ($P < 0,05$).

5.6. DOX, Egzersiz ve Mitokondri Transplantasyonunun Sistemik Etkileri

Böbrek hasarı modelinde düşük doz DOX uygulaması ile serum üre seviyelerinin yüksek bulunduğu gösterilmiştir (195). Çalışmamızda serum üre seviyeleri D ve DM gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Diyabetik iskelet kasında DOX ile indüklenen oksidatif stres LDH seviyelerinin yükselmesine neden olmuştur (269) ve bu yükselen LDH NF- κ B aktivasyonuna yol açmıştır (235). Çalışmamızda, serum LDH düzeyleri ise DOX uygulaması ile artmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bir çalışmada, 15 mg/kg DOX uygulaması ile karaciğer hasarını gösteren ALT ve AST düzeyleri kontrol grubuna göre yükselmiştir (270). Çalışmamızda da serum ALT ve AST düzeyleri D

grubunda kontrol grubuna göre yükselmiştir. Bu yükselmeler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Jabbari ve ark. akut böbrek iskemii-reperfüzyon modelinde *pektoralis majör* kasından aldıkları doku örneğinden izole ettikleri mitokondrileri iskemik böbreğe transplant ettiler. Kan analizleri açısından kan üre nitrojen ve kreatinin değerlerinde önemli azalışları rapor etmişlerdir (271). Arjmand ve ark. gentamisin ile renal proksimal tübüler hücreler üzerinde oluşan toksik hasara karşı izole edilmiş mitokondri nakli etkisini incelemiştir. Tübüler hücrelerde 4 saatlik mitokondri ko-inkübasyonundan sonra LDH aktivitesi azaldığını raporlamışlardır (272). DOX'un neden olduğu toksik etkilerin belirteci olan serum üre analizi ise DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir ($P < 0,05$). Ancak D grubuna göre azalış olmasına rağmen bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Serum LDH düzeyleri ise mitokondri transplantasyonu ile artmış ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca serum ALT ve AST düzeyleri hem kontrol hem de D grubuna göre yükselmiştir. ALT yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber ($P < 0,05$) AST artışı anlamlı değildi.

Üre, amino asit katabolizmasının bir atık ürünüdür. Uzun süreli ve hareketsizlik sırasında bireylerde aşırı protein parçalanması görülür (273). Egzersiz, kas protein sentezi oranlarını hızlandırır ve artan protein sentezi hızı, egzersizden saatler sonra devam eder (274). Egzersiz serum üre konsantrasyonlarını düşürür ve hepatik protein katabolizmasını inhibe edebilir veya renal üre atılımını artırabilir (275). Çalışmalar, egzersizin insülin duyarlılığını, iskelet kası reseptörlerindeki değişiklikleri, glikoz taşıyıcı düzenleyicilerin ifadesi ve ardından lipoliz yoluyla iskelet kasına enerji sağlamak için karaciğer dokusu aktivitesinde artışa neden olan AMP, glikojen sentaz ve lipid metabolizmasını artırdığını göstermiştir (276). Uzun süreli fiziksel egzersiz AST, ALT, kreatin kinaz (CK) ve LDH gibi kas hasarı biyokimyasal belirteçlerinde geçici olarak yükselmeler ile sonuçlanır (277). Akut fiziksel egzersizin etkilerini incelemek için egzersizden altı saat sonra tükenene kadar yüksek yoğunlukta (maksimum oksijen tüketiminin (VO_{2max}) %80'i) koşan sıçanlarda ALT ve AST'de önemli bir artış gözlemlenmiştir (278). Çalışmamızda, egzersizle birlikte

sistemik etkiler gösterilmiştir. Serum üre analizi hem kontrol hem de DM grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P < 0,05$). Egzersizin nefrotoksositeye karşı koruyucu etkisi bu grupta gözlenmiştir. Serum LDH analizlerinde ise egzersizin etkisi kendini göstermiş olup D ve DM grubuna göre düşük bulunmuştur ve bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Ayrıca serum ALT ve AST düzeyleri egzersizin etkisiyle kontrol grubuna göre yükselmiştir. ALT yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber ($P < 0,05$) AST artışı anlamlı bulunmamıştır .

Hasarlı kasta laktat birikimi, kas atrofisinin başka bir göstergesi olarak kabul edilmekte, çünkü artan laktat seviyeleri kas yorgunluğuyla doğrudan ilişkili olup kas kasılma kuvvetini ve enerji metabolizmasını azaltmaktadır. DOX uygulamasından önce koşu bandı egzersizi hepatosit hasarının önlenmesinde önemli sonuçlar göstermiştir (279-281). Çalışmamızda, serum LDH düzeyleri ise DEM grubunda yine azalmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca serum ALT ve AST düzeyleri hem kontrol hem de D grubuna göre DEM grubunda yükselmiştir. ALT yüksekliği kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber ($P < 0,05$) AST artışı anlamlı bulunmamıştır .

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarına göre;

1. Yüksek doz DOX kullanımı akut olarak kas atrofisine neden olmuştur. Bu nedenle, son vücut ağırlıkları, *tibialis anterior* kasının enine kesit alanı, SDH mitokondri enzim aktivitesi, serum üre düzeyleri ve MFN-2 düzeyleri azaldı. Buna karşın kaspaz-3 düzeyi, NF-κB düzeyi ve DRP-1 düzeyleri artmıştır. Kas atrofisinin gelişiminde mitokondriyal enzim, mitokondriyal fizyon ve inflamasyonun etkisi göze çarpmaktadır.
2. Mitokondri transplantasyonu yapılan grupta kas atrofisinin önlenmesinde mitokondriyal parametreler üzerinde olumlu etkiler gözlemlendi. Bu kapsamda, son vücut ağırlıkları, SDH düzeyleri ve MFN-2 düzeyi yükseldi ve NF-κB düzeyi, DRP-1 düzeyi azaldı. Mitokondri transplantasyonunun etkisi daha çok mitokondriyal enzimler, mitokondriyal dinamikler ve inflamasyon üzerinde meydana gelmiştir.
3. Egzersiz yaptırılan grupta ise kas atrofisinin önlenmesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, *tibialis anterior* kas ağırlığı, son vücut ağırlıkları, *tibialis anterior* kası enine kesit alanı, SDH düzeyi, DRP-1 düzeyi, MFN-2 düzeyi ve toplam antioksidan seviyesi artmıştır. Serum üre düzeyleri, kaspaz-3 düzeyi, NF-κB düzeyi ve toplam oksidan seviyesi azalmıştır. Egzersizin etkisiyle literatür ile uyumlu olarak serum ALT düzeyleri de artmıştır. Egzersizin kas atrofisine karşı etkili bir terapötik yöntem olduğu literatürle bağlantılı olarak bu çalışmada açıkça gösterilmiştir. Egzersizin etkisi daha çok mitokondriyal enzimler, mitokondriyal dinamikler, apoptoz, antioksidan seviyeler üzerinde kendini göstermiştir.
4. Mitokondri transplantasyonu ve egzersizin birlikte uygulandığı grupta ise tüm parametrelerde olumlu anlamda en iyi değişiklikler meydana gelmiştir. Buna göre, *tibialis anterior* kas ağırlığı, son vücut ağırlıkları, *tibialis anterior* kası enine kesit alanı, SDH düzeyi ve toplam antioksidan seviyesi artmıştır. Kaspaz-3 düzeyi, NF-κB düzeyi ve DRP-1 düzeyi azalmıştır. Kas atrofisinin önlenmesinde mitokondri transplantasyonu ve egzersizin etkisi ise enine kesit alanının en fazla artışı sağlamış olup, mitokondriyal parametrelerdeki artış kendini göstermiştir.

Bu sonuçlar, egzersizin kas atrofisinin önlenmesindeki rolünün önemli olduğunu ve mitokondri transplantasyonu ile birlikte daha fazla etkili olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmadaki sonuçların ileriki çalışmalara ve klinikte kullanımına ilişkin bazı kritik öneriler de bulunmaktadır. Bunlar:

1. Bu çalışmada kullanılan kas atrofisi modeli DOX dozuna bağlı olarak akut etkileri gösterdiği için tedavi gruplarındaki etkilerin gözlenmesi için erken olabilir. Özellikle sadece mitokondri transplantasyonu yapılan gruplarda bazı yararlı etkilerin gözlenmesi için 48 saatlik DOX süresi yerine 7 ya da 14 günlük bekleme sürelerine ihtiyaç duyulabilir.
2. Bu bekleme sürelerinde DOX için bu çalışmada kullanılan 20 mg/kg dozu yerine daha düşük doz daha uzun süre kullanılabilir. Çünkü yüksek dozda uzun sürelerde hayvan kaybı olasılığı yüksek olarak değerlendirilmiştir.
3. Çalışmamızda hem mitokondri transplantasyonu hem de egzersizin etkileri incelenmiştir. Bu iki koruyucu tedavi şeklinin etkileri çok daha iyi olduğu için klinikte kullanılabilir özellikle olabilir.
4. Transplante edilen mitokondrilerin atrofi oluşmadan önceki egzersiz programı ile etkinliğinin daha arttığı çeşitli parametrelerde gösterilmiş olup, gelecek çalışmalarda ya da klinikte birlikte kullanımı değerlendirilebilir.

Bu çalışmadaki en önemli kısıtlılıklar:

1. Yüksek dozda DOX uygulaması (20mg/kg) hayvan kaybı olasılığını artırdığı için koruyucu tedavilerin uzun süreli etkileri incelenememiştir.
2. Çalışmamız, mitokondri transplantasyonunun koruyucu etkilerini incelemek üzere kas atrofisinden önce uygulandığı için literatürdeki ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bu yüzden hassas bir mitokondri doz çalışması yapılamamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
2. Di Francesco M, Celia C, Cristiano MC, d'Avanzo N, Ruozzi B, Mircioiu C, et al. Doxorubicin Hydrochloride-Loaded Nonionic Surfactant Vesicles to Treat Metastatic and Non-Metastatic Breast Cancer. *ACS Omega*. 2021;6(4):2973-89.
3. Hanušová V, Boušová I, Skálová L. Possibilities to increase the effectiveness of doxorubicin in cancer cells killing. *Drug Metab Rev*. 2011;43(4):540-57.
4. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185-229.
5. van Norren K, van Helvoort A, Argilés JM, van Tuijl S, Arts K, Gorselink M, et al. Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue. *Br J Cancer*. 2009;100(2):311-6.
6. Gilliam LA, St Clair DK. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(9):2543-63.
7. de Lima EA, de Sousa LGO, de STAA, Marshall AG, Zanchi NE, Neto JCR. Aerobic exercise, but not metformin, prevents reduction of muscular performance by AMPk activation in mice on doxorubicin chemotherapy. *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9652-62.
8. Hulmi JJ, Nissinen TA, Räsänen M, Degerman J, Lautaoja JH, Hemanthakumar KA, et al. Prevention of chemotherapy-induced cachexia by ACVR2B ligand blocking has different effects on heart and skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018;9(2):417-32.
9. Wu BB, Leung KT, Poon EN. Mitochondrial-Targeted Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
10. Doerr V, Montalvo RN, Kwon OS, Talbert EE, Hain BA, Houston FE, et al. Prevention of Doxorubicin-Induced Autophagy Attenuates Oxidative Stress and Skeletal Muscle Dysfunction. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3).
11. Asensio-López MC, Soler F, Pascual-Figal D, Fernández-Belda F, Lax A. Doxorubicin-induced oxidative stress: The protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172803.
12. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*. 2011;1(2):941-69.
13. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:37-52.
14. Gilliam LAA, Fisher-Wellman KH, Lin CT, Maples JM, Cathey BL, Neuffer PD. The anticancer agent doxorubicin disrupts mitochondrial energy metabolism and redox balance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:988-96.
15. Yu AP, Pei XM, Sin TK, Yip SP, Yung BY, Chan LW, et al. Acylated and unacylated ghrelin inhibit doxorubicin-induced apoptosis in skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;211(1):201-13.
16. Martínez-Redondo V, Pettersson AT, Ruas JL. The hitchhiker's guide to PGC-1 α isoform structure and biological functions. *Diabetologia*. 2015;58(9):1969-77.
17. de Lima Junior EA, Yamashita AS, Pimentel GD, De Sousa LG, Santos RV, Gonçalves CL, et al. Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7(5):615-25.

18. Morton AB, Mor Huertas A, Hinkley JM, Ichinoseki-Sekine N, Christou DD, Smuder AJ. Mitochondrial accumulation of doxorubicin in cardiac and diaphragm muscle following exercise preconditioning. *Mitochondrion*. 2019;45:52-62.
19. Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2011;110(4):935-42.
20. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2014;117(3):223-30.
21. Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2011;111(4):1190-8.
22. D'Amato M, Morra F, Di Meo I, Tiranti V. Mitochondrial Transplantation in Mitochondrial Medicine: Current Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
23. Orfany A, Arriola CG, Doulamis IP, Guariento A, Ramirez-Barbieri G, Moskowitsova K, et al. Mitochondrial transplantation ameliorates acute limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2020;71(3):1014-26.
24. Alway SE, Paez HG, Pitzer CR, Ferrandi PJ, Khan MM, Mohamed JS, et al. Mitochondria transplant therapy improves regeneration and restoration of injured skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023;14(1):493-507.
25. Kim MJ, Lee JM, Min K, Choi YS. Xenogeneic transplantation of mitochondria induces muscle regeneration in an in vivo rat model of dexamethasone-induced atrophy. *J Muscle Res Cell Motil*. 2023.
26. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*. 1969;11(6):1101-10.
27. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(7):440-6.
28. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2014;10(4):853-8.
29. Hilmer SN, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metab Dispos*. 2004;32(8):794-9.
30. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(2):157-70.
31. Speth PA, Linssen PC, Boezeman JB, Wessels HM, Haanen C. Cellular and plasma adriamycin concentrations in long-term infusion therapy of leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;20(4):305-10.
32. van der Zanden SY, Qiao X, Neefjes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *Febs j*. 2021;288(21):6095-111.
33. Dong KC, Berger JM. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature*. 2007;450(7173):1201-5.
34. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 1984;226(4673):466-8.
35. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*. 2010;17(5):421-33.
36. Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sci*. 2021;278:119527.

37. Lu P. Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. *Semin Nucl Med.* 2005;35(3):197-201.
38. Guigni BA, Callahan DM, Tourville TW, Miller MS, Fiske B, Voigt T, et al. Skeletal muscle atrophy and dysfunction in breast cancer patients: role for chemotherapy-derived oxidant stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018;315(5):C744-c56.
39. Min K, Kwon OS, Smuder AJ, Wiggs MP, Sollanek KJ, Christou DD, et al. Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain activation are required for doxorubicin-induced cardiac and skeletal muscle myopathy. *The Journal of physiology.* 2015;593(8):2017-36.
40. Ou H-C, Chu P-M, Huang Y-T, Cheng H-C, Chou W-C, Yang H-L, et al. Low-level laser prevents doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy by modulating AMPK/SIRT1/PCG-1 α -mediated mitochondrial function, apoptosis and up-regulation of pro-inflammatory responses. *Cell & Bioscience.* 2021;11(1):200.
41. Doerr V, Montalvo RN, Kwon OS, Talbert EE, Hain BA, Houston FE, et al. Prevention of Doxorubicin-Induced Autophagy Attenuates Oxidative Stress and Skeletal Muscle Dysfunction. *Antioxidants.* 2020;9(3):263.
42. Hiensch AE, Bolam KA, Mijwel S, Jeneson JAL, Huitema ADR, Kranenburg O, et al. Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways. *Acta Physiol (Oxf).* 2020;229(2):e13400.
43. Pfeiffer T, Krause U, Thome U, Rajewski A, Skorzek M, Scheulen ME. Tissue toxicity of doxorubicin in first and second hyperthermic isolated limb perfusion--an experimental study in dogs. *Eur J Surg Oncol.* 1997;23(5):439-44.
44. Hayward R, Hydock D, Gibson N, Greufe S, Bredahl E, Parry T. Tissue retention of doxorubicin and its effects on cardiac, smooth, and skeletal muscle function. *J Physiol Biochem.* 2013;69(2):177-87.
45. Nissinen TA, Degerman J, Räsänen M, Poikonen AR, Koskinen S, Mervaala E, et al. Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes. *Sci Rep.* 2016;6:32695.
46. Hydock DS, Lien CY, Jensen BT, Schneider CM, Hayward R. Characterization of the effect of in vivo doxorubicin treatment on skeletal muscle function in the rat. *Anticancer Res.* 2011;31(6):2023-8.
47. Gilliam LA, Lark DS, Reese LR, Torres MJ, Ryan TE, Lin CT, et al. Targeted overexpression of mitochondrial catalase protects against cancer chemotherapy-induced skeletal muscle dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(2):E293-301.
48. Kwon I, Go G-W, Lee Y, Kim J-H. Prolonged Endurance Exercise Adaptations Counteract Doxorubicin Chemotherapy-Induced Myotoxicity in Mice. *Applied Sciences.* 2022;12(7):3652.
49. Zhu H, Sarkar S, Scott L, Danelisen I, Trush MA, Jia Z, et al. Doxorubicin Redox Biology: Redox Cycling, Topoisomerase Inhibition, and Oxidative Stress. *React Oxyg Species (Apex).* 2016;1(3):189-98.
50. Hu BA, Li YL, Han HT, Lu B, Jia X, Han L, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase by vericiguat reduces skeletal muscle atrophy of mice following chemotherapy. *Frontiers in pharmacology.* 2023;14:1112123.
51. Hsieh Li SM, Liu ST, Chang YL, Chen GS, Huang SM. Identification of Agents That Ameliorate Hyperphosphatemia-Suppressed Myogenin Expression Involved in the Nrf2/p62 Pathway in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *International journal of molecular sciences.* 2022;23(23).
52. Wastag M, Biezuńska-Kusiak K, Szewczyk A, Szlasa W, Grimling B, Kulbacka J. Celastrol and Rhynchophylline in the mitigation of simulated muscle atrophy under in vitro. *Saudi*

pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society. 2022;30(10):1387-95.

53. Dessouki FBA, Kukreja RC, Singla DK. Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Doxorubicin-Induced Muscle Toxicity through Counteracting Pyroptosis. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland). 2020;13(12).

54. Gilliam LA, Moylan JS, Patterson EW, Smith JD, Wilson AS, Rabbani Z, et al. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(1):C195-202.

55. Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *Faseb j*. 2003;17(15):2202-8.

56. Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem*. 1990;35(2-3):247-57.

57. Montalvo RN, Doerr V, Min K, Szeto HH, Smuder AJ. Doxorubicin-induced oxidative stress differentially regulates proteolytic signaling in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020;318(2):R227-r33.

58. Smuder AJ, Sollanek KJ, Nelson WB, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, et al. Crosstalk between autophagy and oxidative stress regulates proteolysis in the diaphragm during mechanical ventilation. *Free Radic Biol Med*. 2018;115:179-90.

59. Gilliam LA, Moylan JS, Callahan LA, Sumandea MP, Reid MB. Doxorubicin causes diaphragm weakness in murine models of cancer chemotherapy. *Muscle Nerve*. 2011;43(1):94-102.

60. Souza RWA, Alves CRR, Medeiros A, Rolim N, Silva GJJ, Moreira JBN, et al. Differential regulation of cysteine oxidative post-translational modifications in high and low aerobic capacity. *Scientific Reports*. 2018;8(1):17772.

61. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):571-80.

62. Braun TP, Szumowski M, Levasseur PR, Grossberg AJ, Zhu X, Agarwal A, et al. Muscle atrophy in response to cytotoxic chemotherapy is dependent on intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle. *PLoS One*. 2014;9(9):e106489.

63. Armstrong J, Dass CR. Doxorubicin Action on Mitochondria: Relevance to Osteosarcoma Therapy? *Curr Drug Targets*. 2018;19(5):432-8.

64. Huang L, Li M, Deng C, Qiu J, Wang K, Chang M, et al. Potential Therapeutic Strategies for Skeletal Muscle Atrophy. *Antioxidants* (Basel). 2022;12(1).

65. Wilburn D, Ismaeel A, Machek S, Fletcher E, Koutakis P. Shared and distinct mechanisms of skeletal muscle atrophy: A narrative review. *Ageing Res Rev*. 2021;71:101463.

66. Gejl KD, Hvid LG, Andersson EP, Jensen R, Holmberg HC, Ørtenblad N. Contractile Properties of MHC I and II Fibers From Highly Trained Arm and Leg Muscles of Cross-Country Skiers. *Frontiers in physiology*. 2021;12:682943.

67. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011;91(4):1447-531.

68. Lambole CR, Rouffet DM, Dutka TL, McKenna MJ, Lamb GD. Effects of high-intensity intermittent exercise on the contractile properties of human type I and type II skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* (1985). 2020;128(5):1207-16.

69. Hinde KL, O'Leary TJ, Greeves JP, Wardle SL. Measuring Protein Turnover in the Field: Implications for Military Research. *Adv Nutr*. 2021;12(3):887-96.

70. Rudrappa SS, Wilkinson DJ, Greenhaff PL, Smith K, Idris I, Atherton PJ. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol*. 2016;7:361.

71. Sartori R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nature Communications*. 2021;12(1):330.
72. Kuh D, Bassey EJ, Butterworth S, Hardy R, Wadsworth ME. Grip strength, postural control, and functional leg power in a representative cohort of British men and women: associations with physical activity, health status, and socioeconomic conditions. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2005;60(2):224-31.
73. Evans WJ. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(4):1123s-7s.
74. Timmons JA, Norrbom J, Schéele C, Thonberg H, Wahlestedt C, Tesch P. Expression profiling following local muscle inactivity in humans provides new perspective on diabetes-related genes. *Genomics*. 2006;87(1):165-72.
75. Timmons JA, Gallagher IJ. Molecular studies of exercise, skeletal muscle, and ageing. *F1000Res*. 2016;5.
76. Vandenburg H, Chromiak J, Shansky J, Del Tatto M, Lemaire J. Space travel directly induces skeletal muscle atrophy. *Faseb j*. 1999;13(9):1031-8.
77. Wall BT, Snijders T, Senden JM, Ottenbros CL, Gijsen AP, Verdijk LB, et al. Disuse impairs the muscle protein synthetic response to protein ingestion in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4872-81.
78. Hackney KJ, Ploutz-Snyder LL. Unilateral lower limb suspension: integrative physiological knowledge from the past 20 years (1991-2011). *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(1):9-22.
79. Glover EI, Phillips SM, Oates BR, Tang JE, Tarnopolsky MA, Selby A, et al. Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *J Physiol*. 2008;586(24):6049-61.
80. Suetta C, Frandsen U, Mackey AL, Jensen L, Hvid LG, Bayer ML, et al. Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2013;591(15):3789-804.
81. Dirks ML, Wall BT, Snijders T, Ottenbros CL, Verdijk LB, van Loon LJ. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;210(3):628-41.
82. Brocca L, Cannavino J, Coletto L, Biolo G, Sandri M, Bottinelli R, et al. The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Physiol*. 2012;590(20):5211-30.
83. Wang XD, Kawano F, Matsuoka Y, Fukunaga K, Terada M, Sudoh M, et al. Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(4):C981-9.
84. Alkner BA, Tesch PA. Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2004;93(3):294-305.
85. Lee PHU, Chung M, Ren Z, Mair DB, Kim DH. Factors mediating spaceflight-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022;322(3):C567-c80.
86. Tesch PA, Berg HE, Bring D, Evans HJ, LeBlanc AD. Effects of 17-day spaceflight on knee extensor muscle function and size. *Eur J Appl Physiol*. 2005;93(4):463-8.
87. Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, Colloton PA, et al. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol*. 2010;588(Pt 18):3567-92.
88. Talbert EE, Smuder AJ, Min K, Kwon OS, Szeto HH, Powers SK. Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;115(4):529-38.

89. Lawler JM, Song W, Demaree SR. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(1):9-16.
90. Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva Trejo JA, et al. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy.* 2014;10(4):631-41.
91. Kavazis AN, Talbert EE, Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(6):842-50.
92. Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E, Lundholm K. Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *Int J Cancer.* 2001;93(3):380-3.
93. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 2009;89(2):381-410.
94. Crispino S, Pizzocaro G, Marchini S, Monfardini S. Chemotherapy with adriamycin and vincristine alternated with cyclophosphamide and actinomycin D in testicular germ cell tumors refractory to cisplatin, vinblastine and bleomycin. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1986;22(3):251-6.
95. Siff T, Parajuli P, Razzaque MS, Atfi A. Cancer-Mediated Muscle Cachexia: Etiology and Clinical Management. *Trends Endocrinol Metab.* 2021;32(6):382-402.
96. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):745-56.
97. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 2004;119(2):285-98.
98. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb j.* 2005;19(3):362-70.
99. He WA, Berardi E, Cardillo VM, Acharyya S, Aulino P, Thomas-Ahner J, et al. NF-κB-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4821-35.
100. Marceca GP, Londhe P, Calore F. Management of Cancer Cachexia: Attempting to Develop New Pharmacological Agents for New Effective Therapeutic Options. *Front Oncol.* 2020;10:298.
101. Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science.* 2002;296(5572):1486-8.
102. Chen JL, Walton KL, Winbanks CE, Murphy KT, Thomson RE, Makanji Y, et al. Elevated expression of activins promotes muscle wasting and cachexia. *Faseb j.* 2014;28(4):1711-23.
103. Mirza KA, Tisdale MJ. Functional identity of receptors for proteolysis-inducing factor on human and murine skeletal muscle. *Br J Cancer.* 2014;111(5):903-8.
104. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem.* 2018;119(1):105-10.
105. Matsuyama T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Adachi S, Mizushima K, et al. Tumor inoculation site affects the development of cancer cachexia and muscle wasting. *Int J Cancer.* 2015;137(11):2558-65.
106. Parajuli P, Kumar S, Loumaye A, Singh P, Eragamreddy S, Nguyen TL, et al. Twist1 Activation in Muscle Progenitor Cells Causes Muscle Loss Akin to Cancer Cachexia. *Dev Cell.* 2018;45(6):712-25.e6.
107. Pettersen K, Andersen S, Degen S, Tadini V, Grosjean J, Hatakeyama S, et al. Cancer cachexia associates with a systemic autophagy-inducing activity mimicked by cancer cell-derived IL-6 trans-signaling. *Sci Rep.* 2017;7(1):2046.

108. Penna F, Ballarò R, Martinez-Cristobal P, Sala D, Sebastian D, Busquets S, et al. Autophagy Exacerbates Muscle Wasting in Cancer Cachexia and Impairs Mitochondrial Function. *J Mol Biol.* 2019;431(15):2674-86.
109. Brown JL, Rosa-Caldwell ME, Lee DE, Blackwell TA, Brown LA, Perry RA, et al. Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2017;8(6):926-38.
110. Hou Z, Zhang X, Gao F. Prospective Advances in Beneficial Effects of Exercise on Human Health. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1228:455-9.
111. Dahlqvist JR, Vissing J. Exercise Therapy in Spinobulbar Muscular Atrophy and Other Neuromuscular Disorders. *J Mol Neurosci.* 2016;58(3):388-93.
112. Graham ZA, Lavin KM, O'Bryan SM, Thalacker-Mercer AE, Buford TW, Ford KM, et al. Mechanisms of exercise as a preventative measure to muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021;321(1):C40-c57.
113. Bishop DJ, Botella J, Genders AJ, Lee MJ-C, Saner NJ, Kuang J, et al. High-Intensity Exercise and Mitochondrial Biogenesis: Current Controversies and Future Research Directions. *Physiology.* 2019;34(1):56-70.
114. Shen L, Meng X, Zhang Z, Wang T. Physical Exercise for Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1088:529-45.
115. Borst SE. Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. *Age Ageing.* 2004;33(6):548-55.
116. Oates BR, Glover EI, West DW, Fry JL, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Low-volume resistance exercise attenuates the decline in strength and muscle mass associated with immobilization. *Muscle Nerve.* 2010;42(4):539-46.
117. Testa MTJ, Cella PS, Marinello PC, Frajacomio FTT, Padilha CS, Perandini PC, et al. Resistance Training Attenuates Activation of STAT3 and Muscle Atrophy in Tumor-Bearing Mice. *Front Oncol.* 2022;12:880787.
118. Ferrando AA, Tipton KD, Bamman MM, Wolfe RR. Resistance exercise maintains skeletal muscle protein synthesis during bed rest. *J Appl Physiol (1985).* 1997;82(3):807-10.
119. Padilha CS, Testa MT, Marinello PC, Cella PS, Voltarelli FA, Frajacomio FT, et al. Resistance Exercise Counteracts Tumor Growth in Two Carcinoma Rodent Models. *Med Sci Sports Exerc.* 2019;51(10):2003-11.
120. Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol.* 1999;276(1):C120-7.
121. Pikosky MA, Gaine PC, Martin WF, Grabarz KC, Ferrando AA, Wolfe RR, et al. Aerobic exercise training increases skeletal muscle protein turnover in healthy adults at rest. *J Nutr.* 2006;136(2):379-83.
122. Kim PL, Staron RS, Phillips SM. Fasted-state skeletal muscle protein synthesis after resistance exercise is altered with training. *J Physiol.* 2005;568(Pt 1):283-90.
123. Trenerry MK, Carey KA, Ward AC, Cameron-Smith D. STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2007;102(4):1483-9.
124. Gonzalez AM, Hoffman JR, Stout JR, Fukuda DH, Willoughby DS. Intramuscular Anabolic Signaling and Endocrine Response Following Resistance Exercise: Implications for Muscle Hypertrophy. *Sports Med.* 2016;46(5):671-85.
125. Fernandez-Gonzalo R, Tesch PA, Lundberg TR, Alkner BA, Rullman E, Gustafsson T. Three months of bed rest induce a residual transcriptomic signature resilient to resistance exercise countermeasures. *The FASEB Journal.* 2020;34(6):7958-69.
126. Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, et al. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol (1985).* 2008;104(5):1452-61.

127. Koopman R, Zorenc AH, Gransier RJ, Cameron-Smith D, van Loon LJ. Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(6):E1245-52.
128. Kang C, Ji LL. Muscle immobilization and remobilization downregulates PGC-1 α signaling and the mitochondrial biogenesis pathway. *J Appl Physiol* (1985). 2013;115(11):1618-25.
129. Konopka AR, Harber MP. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exerc Sport Sci Rev.* 2014;42(2):53-61.
130. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002;418(6899):797-801.
131. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan.* 2014;3:6.
132. Gram M, Vigelsø A, Yokota T, Hansen CN, Helge JW, Hey-Mogensen M, et al. Two weeks of one-leg immobilization decreases skeletal muscle respiratory capacity equally in young and elderly men. *Exp Gerontol.* 2014;58:269-78.
133. Tiago F, Úrsula PRS, Stéphanie FSM, Cléber RA, Edilamar MO. Signaling Pathways that Mediate Skeletal Muscle Hypertrophy: Effects of Exercise Training. In: Julianna C, editor. *Skeletal Muscle.* Rijeka: IntechOpen; 2012. p. Ch. 9.
134. Combs AB, Hudman SL, Bonner HW. Effect of exercise stress upon the acute toxicity of adriamycin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1979;23(2):395-8.
135. Powers SK, Duarte JA, Le Nguyen B, Hyatt H. Endurance exercise protects skeletal muscle against both doxorubicin-induced and inactivity-induced muscle wasting. *Pflugers Arch.* 2019;471(3):441-53.
136. Dickinson JM, D'Lugos AC, Mahmood TN, Ormsby JC, Salvo L, Dedmon WL, et al. Exercise Protects Skeletal Muscle during Chronic Doxorubicin Administration. *Med Sci Sports Exerc.* 2017;49(12):2394-403.
137. Kanter MM, Hamlin RL, Unverferth DV, Davis HW, Merola AJ. Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *J Appl Physiol* (1985). 1985;59(4):1298-303.
138. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(44):16260-5.
139. Smuder AJ, Min K, Hudson MB, Kavazis AN, Kwon OS, Nelson WB, et al. Endurance exercise attenuates ventilator-induced diaphragm dysfunction. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(3):501-10.
140. Elbl L, Vasova I, Tomaskova I, Jedlicka F, Kral Z, Navratil M, et al. Cardiopulmonary exercise testing in the evaluation of functional capacity after treatment of lymphomas in adults. *Leuk Lymphoma.* 2006;47(5):843-51.
141. Quinn CJ, Hydock DS. Effects of endurance exercise and doxorubicin on skeletal muscle myogenic regulatory factor expression. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2017;7(3):418-25.
142. Powers SK, Duarte JA, Le Nguyen B, Hyatt H. Endurance exercise protects skeletal muscle against both doxorubicin-induced and inactivity-induced muscle wasting. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.* 2019;471(3):441-53.
143. Ulger O, Kubat GB. Therapeutic applications of mitochondrial transplantation. *Biochimie.* 2022;195:1-15.
144. Kubat GB, Ulger O, Akin S. Requirements for successful mitochondrial transplantation. *Journal of biochemical and molecular toxicology.* 2021;35(11):e22898.

145. Hayashida K, Takegawa R, Shoaib M, Aoki T, Choudhary RC, Kuschner CE, et al. Mitochondrial transplantation therapy for ischemia reperfusion injury: a systematic review of animal and human studies. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19(1):214.
146. Caicedo A, Aponte PM, Cabrera F, Hidalgo C, Khoury M. Artificial Mitochondria Transfer: Current Challenges, Advances, and Future Applications. *Stem Cells Int*. 2017;2017:7610414.
147. Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-5.
148. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*. 2016;212(4):379-87.
149. Rafelski SM. Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biol*. 2013;11:71.
150. Torralba D, Baixauli F, Sánchez-Madrid F. Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016;4:107.
151. Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JF, Gerdes HH. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett*. 2009;583(9):1481-8.
152. Sahinbegovic H, Jelinek T, Hrdinka M, Bago JR, Turi M, Sevcikova T, et al. Intercellular Mitochondrial Transfer in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7).
153. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004;303(5660):1007-10.
154. Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1283-8.
155. Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):732-42.
156. Sun X, Wang Y, Zhang J, Tu J, Wang XJ, Su XD, et al. Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes. *Cell Death Dis*. 2012;3(12):e438.
157. Han H, Hu J, Yan Q, Zhu J, Zhu Z, Chen Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue injured H9c2 cells via transferring intact mitochondria through tunneling nanotubes in an in vitro simulated ischemia/reperfusion model. *Mol Med Rep*. 2016;13(2):1517-24.
158. Li X, Zhang Y, Yeung SC, Liang Y, Liang X, Ding Y, et al. Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(3):455-65.
159. Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, et al. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells*. 2016;34(8):2210-23.
160. Pasquier J, Guerrouahen BS, Al Thawadi H, Ghiabi P, Maleki M, Abu-Kaoud N, et al. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med*. 2013;11:94.
161. Boise LH, Shanmugam M. Stromal Support of Metabolic Function through Mitochondrial Transfer in Multiple Myeloma. *Cancer Res*. 2019;79(9):2102-3.
162. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(5):328-35.
163. Meng W, He C, Hao Y, Wang L, Li L, Zhu G. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. *Drug delivery*. 2020;27(1):585-98.

164. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, Sala E, Shiva S, St Croix CM, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat Commun.* 2015;6:8472.
165. Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature.* 2016;535(7613):551-5.
166. Hough KP, Trevor JL, Strenkowski JG, Wang Y, Chacko BK, Tousif S, et al. Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox biology.* 2018;18:54-64.
167. Fiori MC, Reuss L, Cuello LG, Altenberg GA. Functional analysis and regulation of purified connexin hemichannels. *Frontiers in physiology.* 2014;5:71.
168. Gadicherla AK, Wang N, Bulic M, Agullo-Pascual E, Lissoni A, De Smet M, et al. Mitochondrial Cx43 hemichannels contribute to mitochondrial calcium entry and cell death in the heart. *Basic Res Cardiol.* 2017;112(3):27.
169. Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med.* 2012;18(5):759-65.
170. Li H, Wang C, He T, Zhao T, Chen YY, Shen YL, et al. Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Motor Neurons in Spinal Cord Injury Rats via Gap Junction. *Theranostics.* 2019;9(7):2017-35.
171. Morris RL, Hollenbeck PJ. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci.* 1993;104 (Pt 3):917-27.
172. Maeda A, Fadeel B. Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death Dis.* 2014;5(7):e1312.
173. Liu D, Gao Y, Liu J, Huang Y, Yin J, Feng Y, et al. Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):65.
174. Vignais ML, Levoux J, Sicard P, Khattar K, Lozza C, Gervais M, et al. Transfer of Cardiac Mitochondria Improves the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in a Preclinical Model of Ischemic Heart Disease. *Cells.* 2023;12(4).
175. Fairley LH, Grimm A, Eckert A. Mitochondria Transfer in Brain Injury and Disease. *Cells.* 2022;11(22):3603.
176. Clark MA, Shay JW. Mitochondrial transformation of mammalian cells. *Nature.* 1982;295(5850):605-7.
177. Elliott RL, Jiang XP, Head JF. Mitochondria organelle transplantation: introduction of normal epithelial mitochondria into human cancer cells inhibits proliferation and increases drug sensitivity. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;136(2):347-54.
178. King MP, Attardi G. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell.* 1988;52(6):811-9.
179. Ebert KM, Alcivar A, Liem H, Goggins R, Hecht NB. Mouse zygotes injected with mitochondria develop normally but the exogenous mitochondria are not detectable in the progeny. *Mol Reprod Dev.* 1989;1(3):156-63.
180. Patananan AN, Sercel AJ, Wu T-H, Ahsan FM, Torres A, Kennedy SAL, et al. Pressure-Driven Mitochondrial Transfer Pipeline Generates Mammalian Cells of Desired Genetic Combinations and Fates. *Cell Reports.* 2020;33(13):108562.
181. French CT, Toesca IJ, Wu TH, Teslaa T, Beaty SM, Wong W, et al. Dissection of the Burkholderia intracellular life cycle using a photothermal nanoblade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(29):12095-100.
182. Wu TH, Sagullo E, Case D, Zheng X, Li Y, Hong JS, et al. Mitochondrial Transfer by Photothermal Nanoblade Restores Metabolite Profile in Mammalian Cells. *Cell Metab.* 2016;23(5):921-9.

183. Nzigou Mombo B, Gerbal-Chaloin S, Bokus A, Daujat-Chavanieu M, Jorgensen C, Hugnot JP, et al. MitoCeption: Transferring Isolated Human MSC Mitochondria to Glioblastoma Stem Cells. *J Vis Exp*. 2017(120).
184. Caicedo A, Fritz V, Brondello J-M, Ayala M, Dennemont I, Abdellaoui N, et al. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Scientific Reports*. 2015;5(1):9073.
185. Jain R, Begum N, Tryphena KP, Singh SB, Srivastava S, Rai SN, et al. Inter and intracellular mitochondrial transfer: Future of mitochondrial transplant therapy in Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;159:114268.
186. Macheiner T, Fengler VH, Agreiter M, Eisenberg T, Madeo F, Kolb D, et al. Magnetomitotransfer: An efficient way for direct mitochondria transfer into cultured human cells. *Sci Rep*. 2016;6:35571.
187. Chang JC, Hoel F, Liu KH, Wei YH, Cheng FC, Kuo SJ, et al. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. *Sci Rep*. 2017;7(1):10710.
188. Chang JC, Wu SL, Liu KH, Chen YH, Chuang CS, Cheng FC, et al. Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Transl Res*. 2016;170:40-56.e3.
189. Chang JC, Chang HS, Wu YC, Cheng WL, Lin TT, Chang HJ, et al. Mitochondrial transplantation regulates antitumour activity, chemoresistance and mitochondrial dynamics in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):30.
190. Pourmohammadi-Bejarpasi Z, Roushandeh AM, Saberi A, Rostami MK, Toosi SMR, Jahanian-Najafabadi A, et al. Mesenchymal stem cells-derived mitochondria transplantation mitigates I/R-induced injury, abolishes I/R-induced apoptosis, and restores motor function in acute ischemia stroke rat model. *Brain Res Bull*. 2020;165:70-80.
191. Jia X, Wang Q, Ji J, Lu W, Liu Z, Tian H, et al. Mitochondrial transplantation ameliorates hippocampal damage following status epilepticus. *Animal models and experimental medicine*. 2023.
192. Xie Q, Zeng J, Zheng Y, Li T, Ren J, Chen K, et al. Mitochondrial Transplantation Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Possible Involvement of Mitochondrial Component Separation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021;2021:1006636.
193. Lin MW, Fang SY, Hsu JC, Huang CY, Lee PH, Huang CC, et al. Mitochondrial Transplantation Attenuates Neural Damage and Improves Locomotor Function After Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. *Frontiers in neuroscience*. 2022;16:800883.
194. Chen T, Zhu Y, Jia J, Meng H, Xu C, Xian P, et al. Mitochondrial Transplantation Promotes Remyelination and Long-Term Locomotion Recovery following Cerebral Ischemia. *Mediators of inflammation*. 2022;2022:1346343.
195. Kubat GB, Ozler M, Ulger O, Ekinci O, Atalay O, Celik E, et al. The effects of mesenchymal stem cell mitochondrial transplantation on doxorubicin-mediated nephrotoxicity in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2021;35(1):e22612.
196. Konari N, Nagaishi K, Kikuchi S, Fujimiya M. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5184.
197. Doulamis IP, Guariento A, Duignan T, Kido T, Orfany A, Saeed MY, et al. Mitochondrial transplantation by intra-arterial injection for acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;319(3):F403-f13.
198. Ulger O, Kubat GB, Cicek Z, Celik E, Atalay O, Suvay S, et al. The effects of mitochondrial transplantation in acetaminophen-induced liver toxicity in rats. *Life sciences*. 2021;279:119669.

199. Zhao Z, Hou Y, Zhou W, Keerthiga R, Fu A. Mitochondrial transplantation therapy inhibit carbon tetrachloride-induced liver injury through scavenging free radicals and protecting hepatocytes. *Bioeng Transl Med*. 2021;6(2):e10209.
200. Lin H-C, Liu S-Y, Lai H-S, Lai I-R. Isolated Mitochondria Infusion Mitigates Ischemia-Reperfusion Injury of the Liver in Rats. *Shock*. 2013;39(3):304-10.
201. Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(7):H966-82.
202. Blitzer D, Guariento A, Doulamis IP, Shin B, Moskowitsova K, Barbieri GR, et al. Delayed Transplantation of Autologous Mitochondria for Cardioprotection in a Porcine Model. *Ann Thorac Surg*. 2020;109(3):711-9.
203. Guariento A, Blitzer D, Doulamis I, Shin B, Moskowitsova K, Orfany A, et al. Preischemic autologous mitochondrial transplantation by intracoronary injection for myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2020;160(2):e15-e29.
204. Sun X, Chen H, Gao R, Qu Y, Huang Y, Zhang N, et al. Intravenous Transplantation of an Ischemic-specific Peptide-TPP-mitochondrial Compound Alleviates Myocardial Ischemic Reperfusion Injury. *ACS nano*. 2023;17(2):896-909.
205. Zhang A, Liu Y, Pan J, Pontanari F, Chia-Hao Chang A, Wang H, et al. Delivery of mitochondria confers cardioprotection through mitochondria replenishment and metabolic compliance. *Molecular Therapy*. 2023.
206. Doulamis IP, Nomoto RS, Tzani A, Hong X, Duignan T, Celik A, et al. Transcriptomic and proteomic pathways of diabetic and non-diabetic mitochondrial transplantation. *Scientific reports*. 2022;12(1):22101.
207. Lee AR, Woo JS, Lee SY, Na HS, Cho KH, Lee YS, et al. Mitochondrial Transplantation Ameliorates the Development and Progression of Osteoarthritis. *Immune network*. 2022;22(2):e14.
208. Játiva S, Calle P, Torrico S, Muñoz Á, García M, Martínez I, et al. Mitochondrial Transplantation Enhances Phagocytic Function and Decreases Lipid Accumulation in Foam Cell Macrophages. *Biomedicines*. 2022;10(2).
209. Wu SF, Lin CY, Tsai RK, Wen YT, Lin FH, Chang CY, et al. Mitochondrial Transplantation Moderately Ameliorates Retinal Degeneration in Royal College of Surgeons Rats. *Biomedicines*. 2022;10(11).
210. Chang J-C, Chao Y-C, Chang H-S, Wu Y-L, Chang H-J, Lin Y-S, et al. Intranasal delivery of mitochondria for treatment of Parkinson's Disease model rats lesioned with 6-hydroxydopamine. *Scientific reports*. 2021;11(1):10597.
211. Pang YL, Fang SY, Cheng TT, Huang CC, Lin MW, Lam CF, et al. Viable Allogeneic Mitochondria Transplantation Improves Gas Exchange and Alveolar-Capillary Permeability in Rats with Endotoxin-Induced Acute Lung Injuries. *International journal of medical sciences*. 2022;19(6):1036-46.
212. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2014;117(3):223-30.
213. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protoc*. 2019;9(1).
214. McCue ME, Armien AG, Lucio M, Mickelson JR, Valberg SJ. Comparative skeletal muscle histopathologic and ultrastructural features in two forms of polysaccharide storage myopathy in horses. *Veterinary pathology*. 2009;46(6):1281-91.
215. Rodrigues GS, Godinho RO, Kiyomoto BH, Gamba J, Oliveira AS, Schmidt B, et al. Integrated analysis of the involvement of nitric oxide synthesis in mitochondrial proliferation, mitochondrial deficiency and apoptosis in skeletal muscle fibres. *Sci Rep*. 2016;6:20780.

216. McCully JD, Cowan DB, Pacak CA, Toumpoulis IK, Dayalan H, Levitsky S. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;296(1):H94-h105.
217. Pendergrass W, Wolf N, Poot M. Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A*. 2004;61(2):162-9.
218. Keij JF, Bell-Prince C, Steinkamp JA. Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry*. 2000;39(3):203-10.
219. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(9):3671-5.
220. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018;552:50-9.
221. Shi X, Bai H, Zhao M, Li X, Sun X, Jiang H, et al. Treatment of acetaminophen-induced liver injury with exogenous mitochondria in mice. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2018;196:31-41.
222. Zhao Z, Yu Z, Hou Y, Zhang L, Fu A. Improvement of cognitive and motor performance with mitotherapy in aged mice. *Int J Biol Sci*. 2020;16(5):849-58.
223. Lee JM, Hwang JW, Kim MJ, Jung SY, Kim KS, Ahn EH, et al. Mitochondrial Transplantation Modulates Inflammation and Apoptosis, Alleviating Tendinopathy Both In Vivo and In Vitro. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(5).
224. Akin AT, Öztürk E, Kaymak E, Karabulut D, Yakan B. Therapeutic effects of thymoquinone in doxorubicin-induced hepatotoxicity via oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2021;50(6):908-17.
225. Abdulkareem Aljumaily SA, Demir M, Elbe H, Yigitturk G, Bicer Y, Altinoz E. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects of crocin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Environmental science and pollution research international*. 2021;28(46):65802-13.
226. Hafez A, Jamali Z, Samiei S, Khezri S, Salimi A. Reduction of doxorubicin-induced cytotoxicity and mitochondrial damage by betanin in rat isolated cardiomyocytes and mitochondria. *Human & Experimental Toxicology*. 2021;40(12):2123-34.
227. Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen UP, Setzer B, Walker UA. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol*. 2005;207(4):436-44.
228. Campelj DG, Debruin DA, Timpani CA, Hayes A, Goodman CA, Rybalka E. Sodium nitrate co-supplementation does not exacerbate low dose metronomic doxorubicin-induced cachexia in healthy mice. *Sci Rep*. 2020;10(1):15044.
229. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(1):115-23.
230. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in cardiovascular diseases*. 2007;49(5):330-52.
231. Dirks-Naylor A, Yang S, Kouzi S. The effects of doxorubicin on the mitochondrial dynamics and mitophagy machinery in varying types of skeletal muscles (1164.1). *The FASEB Journal*. 2014;28(S1):1164.1.
232. Catanzaro MP, Weiner A, Kaminaris A, Li C, Cai F, Zhao F, et al. Doxorubicin-induced cardiomyocyte death is mediated by unchecked mitochondrial fission and mitophagy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2019;33(10):11096-108.

233. Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(17):6472-7.
234. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal*. 2002;367(Pt 3):729-40.
235. Remels AH, Gosker HR, Verhees KJ, Langen RC, Schols AM. TNF- α -induced NF- κ B activation stimulates skeletal muscle glycolytic metabolism through activation of HIF-1 α . *Endocrinology*. 2015;156(5):1770-81.
236. Ou HC, Chu PM, Huang YT, Cheng HC, Chou WC, Yang HL, et al. Low-level laser prevents doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy by modulating AMPK/SIRT1/PCG-1 α -mediated mitochondrial function, apoptosis and up-regulation of pro-inflammatory responses. *Cell & bioscience*. 2021;11(1):200.
237. Emani SM, Piekarski BL, Harrild D, Del Nido PJ, McCully JD. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;154(1):286-9.
238. Hayashida K, Takegawa R, Endo Y, Yin T, Choudhary RC, Aoki T, et al. Exogenous mitochondrial transplantation improves survival and neurological outcomes after resuscitation from cardiac arrest. *BMC Med*. 2023;21(1):56.
239. McCully JD, Cowan DB, Emani SM, Del Nido PJ. Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion*. 2017;34:127-34.
240. Ulger O, Kubat GB. Role of Mitochondria and Mitochondrial Transplantation in Drug-induced Toxic Organ Injury. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*. 2023(000):0-.
241. Kim MJ, Hwang JW, Yun C-K, Lee Y, Choi Y-S. Delivery of exogenous mitochondria via centrifugation enhances cellular metabolic function. *Scientific Reports*. 2018;8(1):3330.
242. Xie Q, Zeng J, Zheng Y, Li T, Ren J, Chen K, et al. Mitochondrial Transplantation Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Possible Involvement of Mitochondrial Component Separation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:1006636.
243. Cowan DB, Yao R, Thedsanamoorthy JK, Zurakowski D, Del Nido PJ, McCully JD. Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):17450.
244. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol*. 2022;221(6).
245. Vaamonde-García C, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2012;64(9):2927-36.
246. Berzosa C, Cebrián I, Fuentes-Broto L, Gómez-Trullén E, Piedrafita E, Martínez-Ballarín E, et al. Acute Exercise Increases Plasma Total Antioxidant Status and Antioxidant Enzyme Activities in Untrained Men. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:540458.
247. Cipryan L. The effect of fitness level on cardiac autonomic regulation, IL-6, total antioxidant capacity, and muscle damage responses to a single bout of high-intensity interval training. *Journal of sport and health science*. 2018;7(3):363-71.
248. Kocabaş R, Namiduru ES, Bağçeci AM, Erenler AK, Karakoç Ö, Örkmez M, et al. The acute effects of interval exercise on oxidative stress and antioxidant status in volleyball players. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 2018;58(4):421-7.

249. Andrade-Souza VA, Ghiarone T, Sansonio A, Santos Silva KA, Tomazini F, Arcoverde L, et al. Exercise twice-a-day potentiates markers of mitochondrial biogenesis in men. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2020;34(1):1602-19.
250. Kavazis AN, Smuder AJ, Min K, Tümer N, Powers SK. Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial damage independent of HSP72. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299(5):H1515-24.
251. Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;288(2):R337-44.
252. Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(3-4):517-28.
253. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(2):309-19.
254. The effect of acute exercise on the expression of mitochondria function and content protein in rat skeletal muscle. *Exerc Sci*. 2012;21(2):191-200.
255. Vella L, Caldow MK, Larsen AE, Tassoni D, Della Gatta PA, Gran P, et al. Resistance exercise increases NF- κ B activity in human skeletal muscle. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2012;302(6):R667-73.
256. Liu HW, Chang SJ. Moderate Exercise Suppresses NF- κ B Signaling and Activates the SIRT1-AMPK-PGC1 α Axis to Attenuate Muscle Loss in Diabetic db/db Mice. *Frontiers in physiology*. 2018;9:636.
257. Kwon I. Protective effects of endurance exercise on skeletal muscle remodeling against doxorubicin-induced myotoxicity in mice. *Phys Act Nutr*. 2020;24(2):11-21.
258. Turner JE, Bosch JA, Drayson MT, Aldred S. Assessment of oxidative stress in lymphocytes with exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2011;111(1):206-11.
259. Cipryan L. IL-6, Antioxidant Capacity and Muscle Damage Markers Following High-Intensity Interval Training Protocols. *Journal of human kinetics*. 2017;56:139-48.
260. Min K, Smuder AJ, Kwon OS, Kavazis AN, Szeto HH, Powers SK. Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol (1985)*. 2011;111(5):1459-66.
261. Ascensão A, Magalhães J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(2):H722-31.
262. Ascensão A, Ferreira R, Oliveira PJ, Magalhães J. Effects of endurance training and acute Doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation. *Cardiovasc Toxicol*. 2006;6(3-4):159-72.
263. Ding H, Jiang N, Liu H, Liu X, Liu D, Zhao F, et al. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2010;1800(3):250-6.
264. Greene NP, Lee DE, Brown JL, Rosa ME, Brown LA, Perry RA, et al. Mitochondrial quality control, promoted by PGC-1 α , is dysregulated by Western diet-induced obesity and partially restored by moderate physical activity in mice. *Physiological reports*. 2015;3(7).
265. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):103-15.

266. Mokhtari B, Hamidi M, Badalzadeh R, Mahmoodpoor A. Mitochondrial transplantation protects against sepsis-induced myocardial dysfunction by modulating mitochondrial biogenesis and fission/fusion and inflammatory response. *Molecular Biology Reports*. 2023;50(3):2147-58.
267. Zhang Z, Yan C, Miao J, Pu K, Ma H, Wang Q. Muscle-Derived Mitochondrial Transplantation Reduces Inflammation, Enhances Bacterial Clearance, and Improves Survival in Sepsis. *Shock*. 2021;56(1):108-18.
268. Cloer CM, Givens CS, Buie LK, Rochelle LK, Lin Y-T, Popa S, et al. Mitochondrial transplant after ischemia reperfusion promotes cellular salvage and improves lung function during ex-vivo lung perfusion. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2023.
269. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;496(7444):238-42.
270. Aljobaily N, Viereckl MJ, Hydock DS, Aljobaily H, Wu TY, Busekrus R, et al. Creatine Alleviates Doxorubicin-Induced Liver Damage by Inhibiting Liver Fibrosis, Inflammation, Oxidative Stress, and Cellular Senescence. *Nutrients*. 2020;13(1).
271. Jabbari H, Roushandeh AM, Rostami MK, Razavi-Toosi MT, Shokrgozar MA, Jahanian-Najafabadi A, et al. Mitochondrial transplantation ameliorates ischemia/reperfusion-induced kidney injury in rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(8):165809.
272. Arjmand A, Shiranirad S, Ameritorzani F, Kamranfar F, Seydi E, Pourahmad J. Mitochondrial transplantation against gentamicin-induced toxicity on rat renal proximal tubular cells: the higher activity of female rat mitochondria. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2023;59(1):31-40.
273. Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. 2006.
274. Koopman R, van Loon LJ. Aging, exercise, and muscle protein metabolism. *J Appl Physiol* (1985). 2009;106(6):2040-8.
275. Sokal P, Jastrzębski Z, Jaskulska E, Sokal K, Jastrzębska M, Radziński L, et al. Differences in Blood Urea and Creatinine Concentrations in Earthed and Unearthed Subjects during Cycling Exercise and Recovery. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:382643.
276. Sreenivasa Baba C, Alexander G, Kalyani B, Pandey R, Rastogi S, Pandey A, et al. Effect of exercise and dietary modification on serum aminotransferase levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(1 Pt 1):191-8.
277. Hammouda O, Chtourou H, Chahed H, Ferchichi S, Kallel C, Miled A, et al. Diurnal variations of plasma homocysteine, total antioxidant status, and biological markers of muscle injury during repeated sprint: effect on performance and muscle fatigue--a pilot study. *Chronobiol Int*. 2011;28(10):958-67.
278. Harris MB, Starnes JW. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(5):H2271-80.
279. Ahmadian M, Dabidi Roshan V, Leicht AS. Age-related effect of aerobic exercise training on antioxidant and oxidative markers in the liver challenged by doxorubicin in rats. *Free Radical Research*. 2018;52(7):775-82.
280. Hinkley JM, Morton AB, Ichinoseki-Sekine N, Huertas AM, Smuder AJ. Exercise Training Prevents Doxorubicin-induced Mitochondrial Dysfunction of the Liver. *Med Sci Sports Exerc*. 2019;51(6):1106-15.
281. Zolfaghazadeh F, Roshan VD. Pretreatment hepatoprotective effect of regular aerobic training against hepatic toxicity induced by Doxorubicin in rats. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(5):2931-6.

8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 136

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 25.10.2022 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2022/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2022/29 (ONAY TARİHİ: 24.05.2022)
KARAR NUMARASI	: 2022/09- 09
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 24.05.2027
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Meltem TUNCER
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Gökhan Burçin KUBAT (Doktora Tezi), Doç. Dr.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Meltem TUNCER, Arş. Gör. Özbeyen ATALAY
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	:
SAYISI	: 44 Adet Sprague Dawley Sıçan (4-6 Aylık)

Kurulumuzun 24.05.2022 tarihli toplantısında 2022/29 dosya kayıt numarasıyla onaylanmış olan Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Meltem TUNCER'in araştırma yürütücüsü olduğu "*Doksorubisin ile Oluşturulan Deneysel İskelet Kası Atrofisi Modelinde Mitokondri Transplantasyonu ve Egzersizin Etkileri*" başlıklı proje için verilen 18.10.2022 tarihli dilekçe Kurulumuzun 25.10.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş ve uygun bulunmuştur. Araştırma ekibinden Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi öğretim elemanı Dr. Öner ÜLGER çıkarılmış ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Kurul Üyesi Doç. Dr. Meltem TUNCER çıkarılması nedeniyle tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

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

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara Ayrıntılı Bilgi için:
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_bdk.php

Ek-2. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKELET KASI ATROFİSİ MODELİNDE MİTOKONDİRİ TRANSPLANTASYONU VE EGZERSİZİN ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 8	% 8	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
3	gulhaneeah.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	academic.oup.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

Alıntıları çıkart üzerinde Eşleşmeleri çıkar < 51 words
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

Ek-3. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Gökhan Burçin Kubat
Ödev başlığı:	Doktora
Gönderi Başlığı:	DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKELET KASI A...
Dosya adı:	Doktora_Tezi_Go_khan_Burc_in_Kubat,2023_Bas_m.pdf
Dosya boyutu:	34.25M
Sayfa sayısı:	124
Kelime sayısı:	29,235
Karakter sayısı:	181,935
Gönderim Tarihi:	26-May-2023 09:01ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2101909057



Copyright 2023 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ

