

Kısa Dönem Antrenmanın İskelet Kasında Kaveolin ve VEGF Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Effect of Short Term Training on Caveolin and VEGF Expressions in Skeletal Muscle

Araştırma Makalesi

¹Ali Doğan DURSUN, ²Hakan FIÇICILAR, ²Metin BAŞTUĞ, ²Demet TEKİN

¹Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Dayanıklılık egzersizi iskelet kası ve kardiyovasküler sistemde adaptif değişikliklere yol açmaktadır. Egzersiz anjiyogenezin önemli bir mediatörü olan vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) indüklemektedir. Kaveolin-1 ve -3, kaveoller olarak bilinen hücre membran oluşumlarını oluşturan protein ünitelerdir ve kaveolin-reseptör-postreseptör etkileşimleri yoluyla sinyal iletiminin regülasyonunda aktif rol alırlar. Kaveolin-1'in VEGF ile indüklenen sinyal kaskadında yer aldığı gösterilmiştir. Çalışmada kısa dönem egzersiz antrenmanının farklı lif kompozisyonlarından oluşan iskelet kaslarında VEGF ve kaveolin-1 ve -3 mRNA düzeyleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 3-4 aylık Wistar Albino türü erkek sıçanlara 10 gün süreyle koşu bandına ve egzersize alıştırma programı

ABSTRACT

Endurance training leads to adaptational changes in skeletal muscle and cardiovascular system. Exercise induces vascular endothelial growth factor; one of the important mediator of angiogenesis. Caveolin-1 and -3 are the protein units forming the cell membrane formations as called the caveolae and take an active part in the signal transduction regulation by caveolin-receptor-postreseptor interactions. It has been shown that caveolin-1 takes place in VEGF induced signal cascades. The aim of the study was to investigate the effect of short term training on mRNA levels of VEGF and caveolin-1 and -3 in the skeletal muscles composed of different fiber compositions. 3-4 months aged Wistar Albino rats were accustomed to the treadmill and exercise within a 10 days of adaptation training program. Then rats were divided

uygulandı. Takiben denekler alıştırmaya (n=6) ve antrenman grubu (n=6) olarak ikiye ayrıldı. Antrenman grubu ratlara 3 günlük kısa dönem dayanıklılık antrenmanı yaptırıldı (20-25 metre/dakika, %10 eğim, 85 dakika/gün). Koşu bandı deneylerine katılmayan ratlardan üçüncü deney grubu olarak kontrol grubu oluşturuldu (n=6). Deneklerin gastrocnemius (kırmızı ve beyaz kısımları), plantaris ve soleus kas örneklerinden elde edilen total RNA'larından ters-trankripsiyon PCR ile cDNA sentezlendi. VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, kaveolin-1, kaveolin-3 ve GAPDH PCR amplifikasyonunu takiben agaroz jel elektroforezi ve ardından UV kamera görüntülerinden bant yoğunluk analizleri yapıldı. Antrenman grubunda kontrol ve alıştırmaya gruplarına göre gastrocnemius kası kırmızı kısımda VEGF₁₆₄ mRNA düzeyinde artış olduğu gösterilmiştir (Kruskal Wallis Test: p=0.033, posthoc Tukey HSD: kontrol vs antrenman p=0.014, kontrol vs alıştırmaya p=0.995, alıştırmaya vs antrenman p=0.016). Kaveolin-1 ve -3 düzeylerinde değişiklik saptanmamıştır. VEGF₁₆₄ mRNA'sındaki artış anjiyogenik mekanizmaların tetiklendiğine işaret etmektedir. Anjiyogenik mekanizmalarda kaveolin-VEGF etkileşiminin anlaşılabilmesi için ek çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler

Anjiyogenez, Kaveolin, Egzersiz, Vasküler endotelial büyüme faktörü

Key Words

Angiogenesis, Caveolin, Exercise, Vascular endothelial growth factor

GİRİŞ

Dayanıklılık egzersizinin iskelet kasında ve kardiyovasküler sistemde birçok uyumsal değişikliğe yol açtığı bilinmektedir. Egzersizin indüklediği yaşamsal adaptasyonlardan biri de anjiyogenezdir. İskelet kasında metabolik gereksinim ile kapillerite arasında yakın bir ilişki vardır. Egzersizle indüklenen anjiyogeneze dair "metabolik teorinin" temelini bu ilişki oluşturmaktadır (Gavin ve Wagner, 2001). Bu teoriye göre; kan damarlarının perfüzyon yeteneği ile doku hücrelerinin metabolik gereksinimi arasında uzun süreli bir dengesizliğin varlığı, doku gereksinimini karşılamak üzere damarsal yapıda değişikliğe yol açmaktadır (Adair ve diğ., 1990). Kapiller damar yoğunluğunda meydana gelen artış, oksijen

into two groups as adaptation group (n=6) and training group (n=6). Training group rats underwent a 3 days short term endurance training program (20-25 meter/minute, %10 inclination, 85 minute/day). A control group was formed as a third experimental group from the rats that did not participate in any of the treadmill experiments (n=6). The total RNA obtained from the gastrocnemius (red and white portions), plantaris and soleus muscles, was used to synthesize cDNA via reverse transcription PCR method. Following VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, caveolin-1, caveolin-3 and GAPDH PCR amplifications agarose gel electrophoresis and band density analysis of UV camera images were performed. VEGF₁₆₄ mRNA levels of gastrocnemius muscle red portion were induced in training group comparing to the control and adaptation groups (Kruskal Wallis Test: p=0.033, posthoc Tukey HSD: control vs training p=0.014, adaptation vs training p=0.016, control vs adaptation p=0.995). Caveolin-1 and caveolin-3 levels were unchanged. The increase of VEGF₁₆₄ mRNA levels indicates that the angiogenic mechanisms were triggered. In order to understand the interaction of caveolin-VEGF in angiogenic mechanisms, additional studies are needed.

transportu ve ekstraksiyonu üzerinde etkili olarak, iskelet kasında egzersizin indüklediği aerobik kapasite artışına katkıda bulunmaktadır.

Öte yandan, iskelet kasında damarlanma artışının başlatılması ve sürdürülmesinden sorumlu moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılabilmemiştir. Değişik anjiyogenik faktörler tanımlanmış olmakla birlikte, en büyük ilgi Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) üzerinde odaklanmaktadır. VEGF'nin anjiyogenik süreçle ilgisi in vivo ve in vitro birçok çalışmada gösterilmiştir. Literatürde tek bir akut egzersiz sonrası dahi VEGF mRNA düzeyinde artış bildiren çalışmaların varlığı (Breen ve diğ., 1996; Gavin ve diğ., 2000a; Gavin ve diğ., 2000b; Gustafsson ve

diğ., 1999; Richardson ve diğ., 1999; Richardson ve diğ., 2000) iskelet kasında mikrosirkülasyonun beklenenden daha dinamik bir süreç olduğu ve egzersize kısa süre içinde vasküler adaptasyon gelişebileceğine dair görüşleri kuvvetlendirmektedir. Kısa dönem antrenmanla VEGF'de meydana gelen artışa kapiller yoğunluk artışının eşlik ettiği Amaral ve diğ. (2001) tarafından gösterilmiştir.

Kaveoller hücre membranında 50-100 nm çapında sitoplazmaya doğru girinti yapan ampulmatara şeklinde, hücre membranının fonksiyonel elemanlarının yoğunlaştığı oluşumlardır. Veziküler transport, adezyon, hücrelerarası etkileşim, endotel hücrelerinde hidrostatik basınç ve makaslama kuvveti gibi mekanik olayların resepsiyonu, adipositlerde yoğun olmak üzere lipid regülasyonu, sinyal iletimi ve postreseptör etkileşimler gibi birçok hücre fonksiyonunda rol alırlar.

Kaveol ve kaveolinler görece yeni bir araştırma konusudur ve anjiyogenezdeki rolleri henüz tam anlaşılabilmiş değildir. Kaveolin-1 VEGF ile indüklenen sinyal kaskadında yer almaktadır (Labrecque ve diğ., 2003). Kaveolin-1 ekspresyonu mikrovasküler endotel hücrelerinde endotelial kapiller tüp formasyonunu artırmakta (Liu ve diğ., 2002), kaveolin 1 ekspresyonunun baskılanması ise VEGF aracılı hücre proliferasyonu ve tüp formasyonunu engellemektedir (Liao ve diğ., 2009).

Kaveollerde vasküler permeabilite, vazodilatasyon ve yeni damar oluşumunu aktive eden VEGF reseptörleri bulunur. Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2 (VEGFR-2)'nin VEGF tarafından stimülasyonu anjiyogenezin başlatılmasında anahtar bir role sahiptir (Labrecque ve diğ., 2003). Öte yandan nitrik oksit (NO) VEGF'nin indüklediği anjiyogenezde güçlü bir anjiyogenik ajan olarak karşımıza çıkmaktadır (Sonveaux ve diğ., 2004). Hem VEGFR-2 reseptörünün hem de endotelial NO sentazın kaveollerde birlikte yerleştiği dikkate alındığında yapısal protein olan kaveolinlerin anjiyogenez sürecinde birçok yolla etkili olması muhtemeldir. Griffoni ve diğ. (2000) kaveolin-1 gen ekspresyonu azaltıldığında damar formasyonunun güçlü bir şekilde baskılandığını göstermiş ve kaveolin-1 down-regülasyonunun anjiyogenez

zayıflattığını ileri sürmüşlerdir. Kaveolin-1, Ng ve diğ. (2001) tarafından "VEGF aracılı vasküler morfogenez" ile ilgili genler arasında tanımlanmıştır.

Adaptasyonel değişiklikler daha çok uzun süreli antrenman programlarını takiben bildirilmiş olmakla beraber, bir egzersiz antrenman programının başlamasıyla kısa bir süre içinde bazı uyumsal değişikliklerin gelişebildiği rapor edilmiştir. Egzersizle indüklenen bu adaptasyonların yararlı olduğu ve takip eden egzersiz uygulamalarının hücre içi homeostazda daha az bozulmaya neden olduğu ifade edilmektedir (Gavin ve Wagner, 2001). Bu çalışmada kısa dönem egzersiz antrenmanının anjiyogenik büyüme faktörü VEGF ve VEGF ile indüklenen sinyal kaskadında yer alan kaveolin düzeyleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 03.12.2008 tarih ve 2008-31-142 karar numarası ile alınan etik kurul onayından sonra, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. Hayvanlara uygulanan tüm işlemlerde 'Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals' kurallarına uyuldu.

Deney hayvanı olarak 18 adet 3-4 aylık Wistar Albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. Denekler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Yetiştirme ve Temini Laboratuvarı'ndan temin edildi. Sıçanlar ortam adaptasyonu amacıyla deneyler başlamadan 2 hafta önce Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda antrenman protokolünün uygulanacağı laboratuvara getirildi. Deneyler süresince 22°C'lik klimatize ortamda, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, serbest şekilde su ve besin alarak tutuldular.

Deney Grupları: Deney hayvanları çalışılacak ortam adaptasyon süreci sonunda rastgele olarak önce 6'sı kontrol, 12'si alıştırma ve antrenman gruplarını oluşturacak şekilde ikiye ayrıldı. Tüm antrenman deneyleri 09.00-13.00 saatleri arasında gerçekleştirildi. Deneyler Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Elektronik

Mühendisliği Bölümü tarafından tasarlanmış ve imal edilmiş olan hız, eğim ve ceza kontrolü yapılabilen küçük deney hayvanları için bilgisayarlı motorize koşu bandında gerçekleştirildi.

Kontrol grubu dışındaki hayvanlar 10 gün süreyle “koşu bandına ve egzersize alıştırmaya” programına alındılar. Alıştırma programı benzer antrenman çalışmalarından (Breen ve diğ., 1996; Barnard ve diğ., 1974; Bejma ve diğ., 1999; Harris ve diğ., 2001) yararlanılarak hazırlanmıştır. 10 günlük adaptasyon periyodunu takiben deney hayvanları, antrenman grubu (n=6) ve 10 günlük alıştırmaya etkisinin olup olmadığının araştırılabilmesi amacı ile alıştırmaya grubu (n=6) olarak ikiye ayırıldı. Antrenman grubu sıçanların ortalama vücut ağırlıkları 232 ± 11.31 gram, alıştırmaya grubu sıçanların ortalama vücut ağırlıkları

223 ± 8.59 gram olarak ölçüldü. Kontrol, alıştırmaya ve antrenman gruplarına ait deney akışları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Alıştırma grubu: 10 günlük alıştırmaya sonrası 3 gün dinlenime alınan deney hayvanları 14, 15 ve 16. günlerde koşu bandında 100 dakika süreyle ceza barları ve havalandırma fanı açık şekilde koşu bandı hareketsiz halde iken tutuldular. 16. günde 100 dakika sonunda koşu bandından çıkarılan hayvanların dokuları alındı.

Antrenman grubu: 10 günlük alıştırmaya sonrası 3 gün dinlenimi takiben 14, 15 ve 16. günler antrenman programı uygulandı (Tablo 2). 16. gün antrenmanın bitişini takiben hayvanların dokuları alındı.

Tablo 1. Kontrol, alıştırmaya ve antrenman protokolleri.

Günler	Kontrol grubu	Alıştırma grubu	Antrenman grubu
1	Kafes	Alıştırma protokolü	
2	Kafes	Alıştırma protokolü	
3	Kafes	Alıştırma protokolü	
4	Kafes	Alıştırma protokolü	
5	Kafes	Alıştırma protokolü	
6	Kafes	Alıştırma protokolü	
7	Kafes	Alıştırma protokolü	
8	Kafes	Alıştırma protokolü	
9	Kafes	Alıştırma protokolü	
10	Kafes	Alıştırma protokolü	
11	Kafes	Dinlenim	
12	Kafes	Dinlenim	
13	Kafes	Dinlenim	
14	Kafes	Koşu bandı (hareketsiz)	Antrenman programı
15	Kafes	Koşu bandı (hareketsiz)	Antrenman programı
16	Kafes	Koşu bandı (hareketsiz)	Antrenman programı

Tablo 2. Antrenman protokolü.

Günler	Süre (dakika)	Hız (metre/dakika)	Eğim (°)
14	5	10	5
	5	10	10
	5	15	10
	10	20	10
	75	20-25	10
15	5	10	5
	5	10	10
	5	15	10
	10	20	10
	75	20-25	10
16	5	10	5
	5	10	10
	5	15	10
	10	20	10
	75	20-25	10

Kontrol grubu: Deney programının başlaması ile 16 gün boyunca kafeslerinde tutuldular. Kontrol grubu sıçanların ortalama vücut ağırlıkları 240±19.41 gram olarak saptandı.

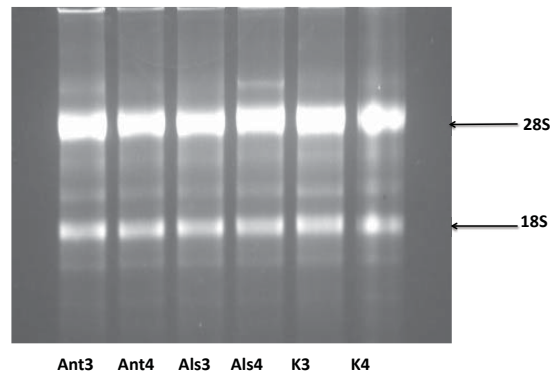
Dokuların Alınması: Deney hayvanlarının anestezisi için intraperitoneal 50mg/kg tiopental sodyum uygulandı. Ağrılı uyarana cevap vermediğinde deney hayvanları cerrahi masaya tespit edilerek göğüs kafesleri açıldı. Sternum ve kostaların ekartasyonunu takiben kalbin büyük damarları klampe edilerek kalp çıkarılarak ötenazi uygulandı. Çalışmada kullanılmak üzere sıçanların sağ arka bacak gastroknemius, plantaris ve soleus kasları çıkarıldı. Gastroknemius kasının kırmızı ve beyaz kısımları makroskopik olarak ayrıldı. Elde edilen dokular sıvı azotta dondurulup moleküler çalışmalar yapılncaya kadar -80°C'de dondurucuda saklandı.

Dokuların Homojenizasyonu ve Total RNA El-

desi: Moleküler çalışmaların yapılabilmesi için 60-80 mg doku örneği porselen havanda sıvı azot varlığında ezildi. Modifiye tek basamaklı guanidinyum tiyosiyanat metodu ile total RNA izolasyonkiti (Qiagen, K74704) kullanılarak yaklaşık 60 µl total RNA elde edildi.

Elde edilen total RNA örneklerinden absorbans ölçümleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalında bulunan spektrofotometrede (NanoDrop® ND-1000) yapıldı. A260/A280 oranı 1,8 ve üzeri, A260/A230 oranı 1,5 ve üzeri ve konsantrasyonu 200 ng/ml ve üzeri olan örnekler ileri basamaklarda kullanıldı.

Absorbans değerleri uygun olmakla beraber RNA'ların intakt kaldığını göstermek amacıyla her örnekten 1000 ng % 1'lik agaroz jelde 1 saat boyunca 100 voltta yürütüldü ve A.Ü. Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Birimi'nde bulunan ultraviyole kamera görüntülendi. 28S ve 18S RNA bantlarının görülmesiyle total RNA'da hasarlanma olmadığı kabul edildi (Şekil 1). İntakt bantlarının görüldüğü örnekler sonraki basamaklarda kullanılırken, bu bantların görülmediği örneklerde homojenizasyon aşamasından itibaren işlemler tekrar yapılmıştır.



Şekil 1. Total RNA jel görüntüsü. Gastroknemius kası kırmızı kısım antrenman (Ant), alıştırma (Als) ve kontrol (K) gruplarının 3. ve 4. örneklerine ait total RNA elektroforezinde 28S ve 18S RNA bantlarının intakt yapısı görülmektedir.

Komplementar Deoksiribonükleik asit (cDNA)

Sentezi: cDNA sentezi cDNA kiti (Fermetas, K1622) kullanılarak sıcaklık döngüleyici (Thermocycler, Techne TC 412)'de yapıldı. 2000 ng total RNA, 1 µl random hexamer primer ve karışım toplamını 12 µl'e tamamlayacak miktarda DEPC uygulanmış su sırasıyla PCR tüpüne konuldu ve pipetajla karıştırıldı. PCR cihazında +70°C'de 5 dakika inkübasyonu takiben 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl ribonükleaz inhibitörü ve 2 µl 10mM dNTP karışımı eklendi. PCR cihazında +25°C'de 5 dakika inkübe edildi. 1 µl reverse transkriptaz eklenerek karışım hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 10 dakika +25°C'de takiben 60 dakika +42°C'de inkübe edildi. 10 dakika +72°C'de tutularak reaksiyon sonlandırıldı. PCR cihazında +4°C'ye kadar kontrollü şekilde soğutulduktan sonra elde edilen 20 µl cDNA -20°C dondurucuda saklandı.

VEGF, Kaveolin-1, -3 ve GAPDH Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

VEGF, kaveolin-1 ve -3 ve GAPDH PCR çalışmalarında 34 µl RNase free su, 3 µl 10X Taq tamponu, 2 µl 10 mM dNTP karışımı, 2+2 µl (forward + reverse) uygun primer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 3 µl cDNA PCR tüpüne pipetlendi. Karışım PCR cihazında +94°C'de 3 dakika inkübe edildi. Takiben 30

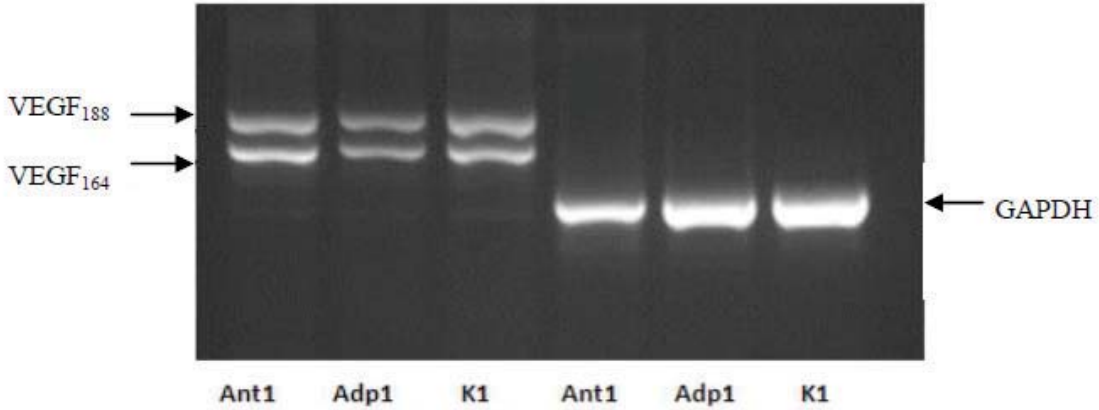
siklus boyunca; 94°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 60 saniye inkübe edildi. 5 dakika +72°C'de tutularak reaksiyon sonlandırıldı. Elde edilen DNA yatay jel elektroforezi yapılıncaya kadar -20°C dondurucuda saklandı. PCR'da kullanılan primerler ile çoğaltılan hedef DNA dizini nükleotid sayıları Tablo 3'te yer almaktadır.

VEGF, kaveolin-1 ve kaveolin-3 PCR ürünlerinden 10 µl; GAPDH PCR ürününden ise 5 µl örnek yükleme boyası ile karıştırılıp %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yüklendi. Bir jelde aynı doku grubunun birer antrenman, alıştırmaya ve kontrol denek hayvanına ait PCR ürünleri ve bunların kontrolü olan GAPDH PCR ürünü yüklendi. Yüklenen jeller 1 saat süresince 100 voltluk akımda yürütme sonrası UV kamerada görüntülendiler (örnek görüntü Şekil 2).

İstatistiksel Analizler: Elde edilen görüntülerde bant yoğunlukları "National Institutes of Health" internet sitesinden serbest olarak indirilip kullanılabilen Image J analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Her kas grubu için antrenman, alıştırmaya ve kontrol grubu deneklerinin VEGF₁₈₈, VEGF₁₆₄, kaveolin-1 ve kaveolin-3 bant yoğunluğu aynı doku GAPDH bant yoğunluğu ile oranlandı. İstatistiksel değerlendirmelerde nonparametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi testi ve posthoc Tu-

Tablo 3. Primer dizinleri ile hedef DNA dizinleri.

Hedef DNA	Primer dizini		Hedef DNA dizini nükleotid sayısı
VEGF ₁₈₈	VEGF-forward VEGF-reverse	5'-CAC CGC CTT GGC TTG TCA CAT-3' 5'-CTG CTC TCT TGG GTG CAC TG-3'	635
VEGF ₁₆₄	VEGF-forward VEGF-reverse	5'-CAC CGC CTT GGC TTG TCA CAT-3' 5'-CTG CTC TCT TGG GTG CAC TG-3'	563
Kaveolin-1	CAV1-forward CAV1-reverse	5'-CTA CAA GCC CAA CAA CAA GGC-3' 5'-AGG AAG CTC TTG ATG CAC GGT-3'	342
Kaveolin-3	CAV3-forward CAV3-reverse	5'-GGA CAT TGT GAA GGT GGA TTT-3' 5'-GCA CTG GAT CTC AAT CAG GTA-3'	247
GAPDH	GAPDH-forward GAPDH-reverse	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	452



Şekil 2. Agaroz jelde "Ant1Adp1K1 Plan VEGF" örneğinin görüntüsü.

key HSD testi (SPSS 15.0) kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak verildi.

BULGULAR

Gastroknemius kası kırmızı kısım VEGF₁₆₄ mRNA ekspresyonunda alıştırma grubunda kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik bulunmazken, antrenman grubunda kontrol ve alıştırma gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (Kruskal Wallis Test: $p = 0.033$, posthoc Tukey HSD: kontrol vs alıştırma $p = 0.995$, kontrol vs antrenman $p = 0.014$, alıştırma vs antrenman $p = 0.016$). VEGF₁₈₈, kaveolin-1 ve kaveolin-3 ekspresyonları için ise gruplar arasında (kontrol, alıştırma, antrenman) istatistiksel olarak önemli fark saptanmadı (Kruskal Wallis Test: VEGF₁₈₈, kaveolin-1 ve kaveolin-3 için p değerleri sırasıyla $p = 0.612$, $p = 0.981$ ve $p = 0.382$).

Gastroknemius kası beyaz kısım VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, kaveolin-1 mRNA düzeyleri ve soleus kası VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, kaveolin-1, kaveolin-3 mRNA düzeyleri dikkate alındığında kontrol, alıştırma ve antrenman grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı.

Plantaris kası VEGF₁₆₄, kaveolin-1 ve kaveolin-3 mRNA düzeyleri için kontrol, alıştırma ve antrenman grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, VEGF₁₈₈ ekspresyonunda alıştırma grubunda kontrol grubuna göre azalma sap-

tandı (Kruskal Wallis Test $p = 0.047$, posthoc Tukey HSD kontrol vs alıştırma $p = 0.028$)

Kontrol grubu gastroknemius kırmızı kısım, gastroknemius beyaz kısım, soleus ve plantaris kaslarına ait VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, kaveolin-1 ve kaveolin-3 mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında; bazal mRNA ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, kaveolin-1 ve kaveolin-3 için sırasıyla Kruskal Wallis Test: $p = 0.086$, $p = 0.134$, $p = 0.357$, $p = 0.755$).

TARTIŞMA

İskelet kasının dayanıklılık tipi antrenmana uyumu iyi bilinmektedir. İskelet kasında gelişen adaptasyonel değişiklikler arasında oksidatif fosforilasyonla ilgili enzimlerin aktivitesinde ve mitokondri içeriğinde meydana gelen artışlar sayılabilir. Antrene kasın artan metabolik aktivitesini karşılamak üzere kapiller yoğunlukta ve/veya kapiller-fibril oranında artışla karakterli bir anjiyogenik yanıtın da eşlik etmesi sözkonusudur. İskelet kasında anjiyogenik yanıtta başta VEGF olmak üzere çok sayıda anjiyogenik faktörün aracılık ettiği bilinmektedir. VEGF in vivo ve in vitro bilinen en potent ve direkt anjiyogenik faktördür.

VEGF ailesi ortak VEGF bölgesine sahip, en önemlisi VEGF-A (bundan sonra VEGF olarak anılacak olup insanlarda 121, 145, 148, 165, 183, 189 ve 206 amino asit; kemirgenlerde ise birer amino asit eksik olmak üzere 7 izoformu mevcuttur.) olan

yedi üyeden oluşur. VEGF'nin mitojenik, anjiyogenik ve permeabilite artışı etkilerinden major olarak sorumlu olan VEGFR-2, embriyonik dönemde daha fazla sentezlenip anjiyogenezde negatif regülatör olan VEGFR-1, lenfanjiyogenez ve yara iyileşmesinde görev alan VEGFR-3 olmak üzere 3 tirozin kinaz reseptörü ve 2 koreseptörü bulunmaktadır.

Elektriksel stimülasyon (Annex ve diğ., 1998; Hang ve diğ., 1995) ve akut, kısa dönem ve kronik antrenman programlarını takiben VEGF'nin serum, doku mRNA ve protein seviyelerinin arttığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Suhr ve diğ. (2007), yaptıkları çalışmada ekzojen vibrasyon stimulusu eklenerek yapılan şiddetli akut bisiklet egzersizinden hemen sonra serum VEGF düzeyinin önemli bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Breen ve diğ. (1996) ratlarda 1 saatlik koşu egzersizinden sonra (20 m/dakika, % 10 eğim, 1 saat) gastroknemius kası VEGF, bFGF ve TGF- β 1 mRNA'sında artış bildirmişlerdir. Gavin ve diğ. (2000b) ratlarda 1 günlük koşu egzersizinden sonra (20 m/dakika, % 10 eğim, 1 saat) gastroknemius kası VEGF ve VEGFR-1 (Flt-1) mRNA düzeylerinde sırasıyla 4.8 ve 1.7 kat artış meydana geldiğini, VEGFR-2 (Flk-1) mRNA düzeyinde ise artış olmadığını saptamışlardır. Kivela ve diğ. (2008) normoglisemik ve diyabetik farelerde 1 günlük koşu bandı egzersizinden (21 m/dakika, % 2.5 eğim, 1 saat) 3 saat sonra gastroknemius kası VEGF-A, VEGF-B ve VEGFR-2 mRNA seviyelerinde farklılık olmadığını, 6 saat sonra ise normoglisemik farelerde VEGF-A ve VEGFR-2 mRNA seviyelerinde artış olduğunu saptamışlardır. Tang ve diğ. (2010) 6-8 haftalık farelerde 1 saatlik (24 m/dakika, % 10 eğim) egzersizden 1 saat sonra gastroknemius, soleus, plantaris ve tibialis anterior kaslarında VEGF mRNA ve protein seviyelerinde artış tespit etmişlerdir. Ding ve diğ. (2006) yaşlı Fisher 344 dişi ratlara yaptırılan günde 30 dakika süreli 3 haftalık koşu bandı egzersizi ile serebral damarlanmada, VEGF₁₂₀ ve VEGF₁₄₄ de daha fazla olmak üzere VEGF'nin 4 izoformunda (120, 144, 164, 188) mRNA seviyelerinde artış göstermişlerdir.

Literatürde kısa dönem antrenman protokolü kullanılarak VEGF protein ve mRNA düzeylerinin incelendiği çok az sayıda çalışma mevcuttur. Ga-

vin ve Wagner (2001) ratlarda 5 günlük antrenman programının (20 m/dakika, 10° eğim, 1 saat/gün) her gününden sonra (en belirgin olarak 1. günde olmak üzere) gastroknemius kası VEGF ve TGF- β 1 mRNA düzeyinde artış bildirmişlerdir. Gustafsson ve diğ. (2002), kısa süreli (10 günlük bir periyod içinde toplam 7 tekrar içeren) unilateral diz-ekstansiyon egzersiz antrenmanı yaptırılan bireylerde vastus lateralis kası VEGF mRNA ve protein düzeylerinde artış bildirmişlerdir. Amaral ve diğ. (2001) koşu bandında kısa dönem antrenman protokolü (20 m/dakika, % 5 eğim, 1 saat/gün) uyguladıkları ratlarda sadece 3 günlük egzersizin tibialis anterior ve gastroknemius kaslarında damar yoğunluğu ile birlikte VEGF protein ekspresyonunda artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Amaral ve diğ. (2008)'nin bir diğer çalışmasında dişi spontan hipertansif (SHR) ve Wistar Kyoto (WKR) ratlarda adaptasyonu takiben 3 günlük kısa dönem antrenman sonrası VEGF protein seviyelerinde tibialis anterior kasında SHR ve WKR ratlarda sırasıyla % 36 ve % 28 artış olduğu, temporalis kasında ise değişiklik tespit edilmemiştir.

Çalışmamızın bulguları Gavin ve Wagner (2001)'a ait çalışmanın bulguları ile uyumlu olmakla beraber daha ayrıntılı sonuçlar ortaya koymaktadır. Gavin ve Wagner (2001) gastroknemius kasındaki VEGF mRNA artışını kasın bütününe analiz ederek göstermişlerken, çalışmamızda gastroknemius kasının kırmızı (oksidatif) ve beyaz (glikolitik) kısımları ayrı ayrı incelenmiş, ayrıca soleus ve plantaris kas örnekleri de incelemeye dahil edilmiştir. Bu şekilde VEGF ile ilgili hipotezin farklı lif kompozisyonuna sahip kas gruplarında test edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda incelenen kas gruplarının fibril kompozisyonları Tablo 4'te verilmiştir.

Çalışmamızda gastroknemius kırmızı kısım için saptanan VEGF₁₆₄ mRNA artışı Brutsaert ve diğ. (2002)'nin bulguları ile uyumludur. Brutsaert ve diğ. (2002); in situ hibridizasyon tekniği ile VEGF mRNA transkriptlerini fibril spesifik olarak gösterdikleri bir çalışmada, egzersizle ve elektriksel stimülasyon protokolleri uygulayarak, rat gastroknemius kasında oksidatif kapasitesi yüksek tip I ve IIa fibrillerden yoğun derin kısımlarında oksida-

Tablo 4. Kas fibril oranları. Gastroknemius kası kırmızı kısım (GR), gastroknemius kası beyaz kısım (GW), soleus(S) ve plantaris(P) kasları farklı oranlarda (%) tip I, IIa, IIb/x ve IIb fibrillerden oluşmaktadır (Delp ve Duan, (1996)'dan yararlanılmıştır).

	I (%)	IIa (%)	IIb/x (%)	IIb (%)
GR	51	35	13	1
GW	0	0	8	92
S	84	7	9	0
P	6	14	33	47

tif kapasitesi düşük tip IIb ve IIb/x fibrillerini içeren yüzeysel kısımlarına göre VEGF sinyal yoğunluğunu daha belirgin olarak rapor etmişlerdir. Kaslarda primer olarak oksidatif fibrillerden oluşan bölgelerde kapilleritenin daha yoğun olduğu ve/veya egzersiz sırasında bu bölgelerdeki kan akımının daha fazla olduğu dikkate alındığında VEGF sinyalinde gözlenen bölgesel farklılığın fibril fenotipindeki dolayısıyla kapilleritedeki farklılıkla açıklanabileceği ileri sürülmüştür. Çalışmamızda gastroknemius kırmızı kısım için VEGF₁₆₄ saptanan artışın oksidatif fibrillerden zengin bir diğer kas grubu olan soleus için saptanmamış olması her iki kas grubu arasında tip IIa fibril yüzdesindeki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Bunun yanında çalışmamızda VEGF₁₆₄ ve VEGF₁₈₈ izoformları ayrı ayrı değerlendirilmiş olup Gavin ve Wagner (2001)'in gerçekleştirildikleri çalışmada VEGF'nin hangi izoformunun incelendiği hakkında bilgi bulunmamaktadır. Çeşitli VEGF izoformlarının damarsal yapıda ve arteriyel gelişimde farklı rolleri olmakla beraber damarsal gelişimde santral rol VEGF₁₆₄ izoformununundur (Takahashi ve diğ., 2005).

Çalışmamızın gerek Gavin ve Wagner (2001) gerekse kısa dönem antrenman protolü uygulayan diğer çalışmalardan önemli bir farkı da deney grupları arasına "alıştırma" grubunun eklenmiş olmasıdır. Deneklerin esas antrenman programına uyum sağlayabilmeleri için uygulanan "alıştır-

ma" programının etkisini göstermek üzere deney protokülüne alıştırma grubunun dahil edilmemiş olması literatürde önemli bir genel eksiklik olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla kısa dönem antrenman protokülü ile VEGF düzeylerinde artış saptanan çalışmalarda, uygulanan alıştırma programlarının bu artışa katkıda bulunup bulunmadığının yanıtı açık değildir. Sonuçlar çalışmamızda uygulanan "alıştırma programının" gastroknemius kırmızı kısım VEGF mRNA düzeylerinde (164 ve 188) artış oluşturacak nitelikte olmadığını ortaya koymaktadır. "alıştırma programı" ile amaçlanan, moleküler bir yanıtı yol açmaksızın deneklerin koşu bandında egzersiz istenilen süre ve şiddette sürdürülebilmesine uyumlandırılmaları olduğu göz önüne alındığında, alıştırma grubundan elde edilen sonuçlar metodolojik olarak "hedeflenen" sonuçlardır.

Egzersiz VEGF ekspresyonunda neden olduğu artışın altında yatan mekanizmalar hala tam olarak açık değildir. Egzersizin indüklediği anjiyogenezis ve VEGF artışında "hipoksi" bir tetikleyici faktör olarak düşünülmektedir (Hudlicka ve diğ., 1992). Breen ve diğ. (1996) 1 saatlik egzersiz (15 m/dakika) veya hipoksinin iskelet kasında birbirinden bağımsız olarak VEGF gen ekspresyonunu artırabildiğini ve ekspresyondaki artışın egzersiz hipoksik koşullar altında yapıldığı zaman daha büyük olduğunu bildirmişlerdir. Bulguların bir "erken gen yanıtı" na işaret ettiği, yanıtların kantitatif olarak egzersiz şiddetine bağımlı olduğu ve VEGF yanıtının hipoksi ile güçlendiği sonucuna ulaşılmıştır. Hipoksinin VEGF gen ekspresyonunda artışa yol açtığını gösteren birçok çalışmanın varlığından hareketle, büyüme faktörünün ekspresyonu için fizyolojik stimulusun "lokal PO₂" olabileceği, dinlenimden egzersize geçilmesiyle venöz ve belki daha önemli olarak intrasellüler PO₂deki lokal düşüşün VEGF indüksiyonunda kuvvetle muhtemel önemli olduğu Breen ve diğ. (1996) tarafından savunulmuştur. Gavin ve Wagner (2001)'in egzersiz şiddetinin anjiyogenik büyüme faktör cevabı üzerindeki etkisini incelemek için sıçanları koşu bandında 10 derece eğimde, 1 saat süreyle 3 farklı hızda (15, 20 ve 25 m/dakika) koşturmak suretiyle gerçekleştirdikleri çalışmada 15 m/daki-

ka hızla koşan deneklerde kontrol grubuna göre ve 20 m/dakika hızla koşan deneklerde 15 m/dakika hızla koşan deneklere göre gastrocnemius VEGF mRNA sında artış meydana geldiği, ancak 25 m/dakika hızla koşan deneklerde ekspresyonda daha fazla bir artış oluşmadığı saptanmıştır. Bulgular "intrasellüler PO₂'nin iskelet kası VEGF gen ekspresyonunu regüle edebildiği" hipotezi ile uyumlu olarak yorumlanmış, ve bir PO₂ eşliği olabileceği ve intrasellüler PO₂'de bu eşğin altında meydana gelen azalmaların egzersizin indüklediği VEGF mRNA yanıtında daha fazla artışa neden olmadığını ileri sürmüşlerdir. Hipoksinin etkisi doğrudan PO₂'deki değişiklikler yoluyla olabileceği gibi PO₂'deki değişikliklere ikincil olarak gelişen basınç ve/veya akım değişiklikleri yoluyla indirekt olarak da meydana gelebileceği de ileri sürülmüştür (Hudlicka ve diğ., 1992). VEGF ekspresyonu ve egzersizle indüklenen anjiyogenezden "mekanik faktörler" de sorumlu tutulmaktadır (Gavin ve Wagner., 2001). Bu teoriye göre artan kan akımı 1) endotel hücreleri ile kan bileşenleri arasındaki etkileşim 2) makaslama kuvveti (shear stress) ve 3) duvar geriminde artışa neden olmaktadır.

Kaveollerin yapısını oluşturan kaveolinlerin kaveolin-1, -2 ve kaveolin-3 olarak 3 üyesi vardır. Adiposit, fibroblast, endotel ve düz kas hücrelerinde yoğun olmak üzere birçok hücrede gösterilmiş olan kaveolin-1, kaveol formasyonunda ve fonksiyonlarında etkin iken, kaveolin-2 kaveol formasyonu için gereklidir ve kaveolin-3 iskelet ve kalp kasında yoğun olarak bulunup kaveolin-1'in bulunduğu hücrelerdeki etkisine benzer işlevlere sahiptir. Kaveolinler hücre sinyal kaskadlarının komponentleri ile etkileşerek bu kaskadlarda stimülasyon ya da inhibisyon etkisi ortaya çıkarmaktadır (Hardin ve diğ., 2006; Patel ve diğ., 2008). Anjiyogenezis damar endotel hücrelerinin proliferasyonu yoluyla yeni kan damarlarının oluştuğu bir süreçtir. Kaveolin-1 ve -2'nin damar endotel hücrelerinde hem in vivo ve hem in vitro olarak yüksek miktarda eksprese edildiği bilinmektedir. Mikrovasküler endoteliumda VEGF'nin kaveolün potent bir indüktörü olduğu gösterilmiştir (Vasile ve diğ., 1999; Yokomori ve diğ., 2003). Kaveolin-1 ekspresyonunun mikrovasküler endotel hücrelerinde endotelial

kapiller tüp formasyonunu artırdığı (Penumathsa ve diğ., 2008), ve hücre migrasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Grande-Garcia ve diğ., 2008; Navarro ve diğ., 2004). Kaveolinlerin VEGF ve ardışık sinyal yollarında etkin rolleri bulunmaktadır (Labrecque ve diğ.,2003). Koyun fetoplasental arteriyel endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada VEGF uyarımıyla hücre proliferasyonu ve tüp formasyonu gerçekleşirken, kaveolin-1 ekspresyonunun baskılanmasıyla hücrelerde VEGF ile ERK2/1 aktivasyonu olmamış, VEGF aracılı hücre proliferasyonu ve tüp formasyonu görülmemiştir (Liao ve diğ., 2009).

Kaveollerde vasküler permeabilite, vasodilatasyon ve yeni damar oluşumunu aktive eden VEGF reseptörleri bulunur. VEGFR-2'nin VEGF tarafından stimülasyonu anjiyogenezin başlatılmasında anahtar bir role sahiptir. Labrecque ve diğ. (2003) tarafından VEGFR-2'nin endotelial kaveollerde kaveolin-1 ile ilişkili şekilde lokalize olduğu ve bu kompleksin VEGF stimülasyonu ile hızlı bir şekilde ayrıldığı rapor edilmiştir. Öte yandan NO VEGF'nin indüklediği anjiyogeneziste güçlü bir anjiyogenik ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Sonveaux ve diğ. (2004) kaveolin-1 geninden yoksun (caveolin-1 knockout, Cav1^{-/-}) farelerde femoral arter rezeksiyonundan sonra gelişen adaptif anjiyogenezin NOS inhibitörü L-NAME uygulanan Cav1^{+/+} farelerde olduğu gibi yetersiz olduğunu, Cav1^{-/-} aortadan elde edilen endotel hücrelerinde VEGF uyarımıyla NO üretimi ve endotelial tüp formasyonunun dramatik olarak kaybolduğunu, Cav1^{-/-} endotel hücrelerde VEGF'nin indüklediği ERK ve endotelial NOS (eNOS) aktivasyonunun benzer şekilde değiştiğini, Cav1^{-/-} endotel hücrelere kaveolin transfekte edildiğinde VEGF'nin indüklediği ERK ve eNOS aktivasyonunun restore olduğunu göstermişlerdir. Pan YM ve diğ. (2006) 3-D fibrin jel anjiyogenez modelinde VEGF'ye yanıt olarak kaveolin-1 mRNA düzeylerinin arttığını, eNOS mRNA ekspresyonu değişmemekle beraber NO üretimi ve kapiller benzeri tüp formasyonunun arttığını, L-NAME uygulamasının VEGF'nin NO üretimi ve tüp formasyonu üzerindeki etkilerini bloke ettiğini, kaveolin-1 ekspresyonunun baskılanmasıyla tüp oluşumunun azaldığını ve VEGF uyarı-

mina NO üretimi ve tüp formasyonu yanıtlarının oluşmadığını göstermişlerdir. Hem VEGFR-2'nin hem de eNOS'un kaveollerde birlikte yerleştiği dikate alındığında yapısal protein olan kaveolinlerin anjiyogenez sürecinde birçok yolla etkili olması muhtemeldir. Griffoni ve diğ. (2000) kaveolin-1 gen ekspresyonu azaltıldığında damar formasyonunun güçlü bir şekilde baskılandığını göstermiş ve kaveolin-1 down-regülasyonunun anjiyogenezı zayıflattığını ileri sürmüşlerdir.

Literatürde egzersizde kaveolin düzeylerinin incelendiği çok az çalışmaya rastlanmaktadır. Lee ve diğ. (2006) 6 haftalık WKR ve SHR'lerde yapılan 12 haftalık koşu bandı egzersizinde (1 haftalık adaptasyonu takiben 20 m/dakika % 0 eğim, 60 dakika/gün) kaveolin-3 ve eNOS mRNA seviyelerinin egzersiz yaptırılan SHR ratlarda kontrol SHR ve WKR'lere göre arttığını göstermişlerdir. Oh ve diğ. (2007) tarafından kuyruklarına ağırlık bağlanarak merdiven çıkma şeklinde direnç ve ilk 2 hafta 40 dakika/gün devamında 6 hafta 50 dakika/gün 20 m/dakika hızda koşu bandı egzersizi yaptırılan yaşlı ratlarda soleus kası kaveolin protein düzeyinde değişiklik saptanmamış, ekstensor digitorum longus kasında direnç egzersizi ile kaveolin-1 ve kaveolin-3 protein seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Giusti ve diğ. (2009) 10 hafta koşu bandında koşturulan ratlarda (25 m/dakika, % 10 eğim, 3 gün/hafta, maksimum aerobik gücün % 60 şiddetinde) sol ventrikül kaveolin-3 ve HIF-1 α mRNA ekspresyonlarında ve kaveolin-3 protein seviyelerinde artış bildirmişlerdir. 14 pentatlon atletinde 100 ve 1500 metre yüzme egzersizi önce ve sonrasında deltoid kasında kaveolin-1 seviyesinin 1500 m egzersizi ile % 17, vastus lateralis kasında 1500 m deneyinden sonra kaveolin-1 ve -3 seviyelerinin sırasıyla % 120 ve 46 arttığı gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2009).

Literatürde kronik egzersiz uygulaması ile kaveolin düzeylerinde artış bildiren çalışmalar bulunmakla beraber, çalışmamızda kısa dönem antrenman programının iskelet kası kaveolin-1 ve -3 düzeyleri üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamız ayrıca VEGF ve kaveolin düzeylerinin birlikte incelendiği ilk egzersiz çalışmasıdır. Çalışmanın sonuçları iskelet kası VEGF₁₆₄

düzeyinde artışa neden olan kısa dönem egzersiz protokolünün iskelet kasında endotel ve kas hücresi kaynaklı kaveolin düzeylerinde bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Bunun bir olası nedeni, VEGF mRNA düzeyinde gözlenen artışın, hücrede çok çeşitli fonksiyonlarda rol aldığı bilinen kaveolinlerin ekspresyonunda artışa yol açabilecek ölçüde, VEGF protein düzeyinde artışa yol açmamış olmasıdır.

Çalışmamızda kontrol gruplarına ait VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, kaveolin-1 ve kaveolin-3 mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında gastroknemius kırmızı kısım, gastroknemius beyaz kısım, soleus ve plantaris kaslarının bazal mRNA ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır. Bu bulgular, Brutsaert ve diğ. (2002) nin kontrol grubu kaslarda VEGF mRNA düzeyinde oksidatif ve glikolitik kısımlar açısından bölgesel bir farklılık olmadığını bildiren bulguları ile uyumludur. Öte yandan Annex ve diğ. (1998)'nin VEGF protein/total protein oranının oksidatif (tip I) kaslarda glikolitik (tip II) kaslara göre daha büyük olduğunu gösterdikleri çalışmanın bulguları ile uyumlu değildir. Annex ve diğ. (1998) yüksek VEGF protein düzeylerinin oksidatif iskelet kas fenotipinin bir bileşeni olduğunu ve glikolitik kaslara göre oksidatif kaslarda mevcut yüksek damar yoğunluğunun sürdürülmesinde ve damarlanma artışının sağlanmasında VEGF'nin önemli bir role sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir. İskelet kasında bazal kaveolin-1 ve -3 seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın bulguları kısa dönem dayanıklılık tipi antrenmanın esas olarak tip I ve tip II liflerden oluşan gastroknemius kası kırmızı kısımda major anjiyogenik faktör olan VEGF'nin (VEGF₁₆₄ izoformu) mRNA düzeyinde artışa neden olduğunu göstermiştir. VEGF mRNA artışının anjiyogenik süreçteki rolleri henüz tartışmalı olan kaveolinlerin düzeyinde bir artışa neden olacak şiddette olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışma fibril kompozisyonunda bir değişim olup olmadığı ve VEGF artışını damarlanmada bir değişikliğin izleyip izlemediği sorularına yanıt geti-

rebilmiş değildir. Bununla beraber, çalışma mRNA düzeyleri ile sınırlıdır ve mRNA düzeyinde saptanan artışın VEGF protein düzeyinde artışa neden olup olmadığı açık değildir. Konuyla ilgili olarak gelecek çalışmalara ışık tutacak öneriler aşağıda sıralanmıştır:

- Kapiller dansite, fibril-kapiller oranı ve kas fibril kompozisyonları immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmelidir.
- VEGF ve diğer anjiyogenik faktörlerin mRNA ile birlikte protein düzeyleri saptanmalıdır.
- VEGF aracılı sinyal kaskadında görevli diğer moleküller (VEGFR-2 ve eNOS başta olmak üzere) incelenmelidir.
- Gerek VEGF gerekse anjiyogenezin zaman bağımlı incelenmesi amacıyla farklı antrenman gruplarının deneysel desene dahil edilmelidir.

Yazar Notu: Makale Uzm. Dr. Ali Doğan Dursun'un Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yapmış olduğu uzmanlık tez çalışmasının özetidir.

Çalışmamız, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 38. Ulusal Kongresi'nde (25-29 Eylül 2012 Trabzon) sözlü olarak sunulmuş olup sözlü sunu üçüncülük ödülü verilmiştir.

Yazışma Adresi (Corresponding address)

Uzm. Dr. Ali Doğan Dursun

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

E-mail: alidogandursun@gmail.com

Tel No: 0318 3385020

KAYNAKLAR

1. Adair TH, Gay WJ, Montani JP. (1990). Growth regulation of the vasculature system: evidence for a metabolic hypothesis. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 259, R393-R404.
2. Amaral SL, Papanek PE, Greene AS. (2001). Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 281, H1163-H1169.
3. Amaral SL, Sanchez LS, Chang AJ, Rossoni LV, Michelini LC. (2008). Time course of training-induced microcirculatory changes and of VEGF expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(5), 424-31.
4. Annex BH, Torgan CE, Lin P, Taylor DA, Thompson MA, Peters KG ve diğ. (1998). Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 274, H860- H867.
5. Barnard RJ, Duncan HW, Thorstenson AT. (1974). Heart rate responses of young and old rats to various levels of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 36(4), 472-474.
6. Bejma J, Ji LL. (1999). Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 87, 465-470.
7. Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD. (1996). Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 81, 355-361.
8. Brutsaert TD, Gavin TP, Fu Z, Breen EC, Tang K, Mathieu-Costello O ve diğ. (2002). Regional differences in expression of VEGF mRNA in rat gastrocnemius following 1 hr exercise or electrical stimulation. *BMC Physiology*, 2, 8.
9. Delp MD, Duan C. (1996). Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *Journal of Applied Physiology*, 80, 261-270.
10. Ding YH, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. (2006). Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Current Neurovascular Research*, 3(1), 15-23.
11. Gavin TP, Spector DA, Wagner H, Breen EC, Wagner PD. (2000a). Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *Journal of Applied Physiology*, 88, 1192-1198.
12. Gavin TP, Spector DA, Wagner H, Breen EC, Wagner PD. (2000b). Effect of captopril on skeletal muscle angiogenic growth factor responses to exercise. *Journal of Applied Physiology*, 88, 1690-1697.
13. Gavin TP, Wagner PD. (2001). Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene responses in rats. *Journal of Applied Physiology*, 90, 1219-1226.
14. Giusti B, Marini M, Rossi L, Lapini I, Magi A, Capalbo A, ve diğ. (2009). Gene expression profile of rat left ventricles reveals persisting changes following chronic mild exercise protocol: implications for cardioprotection. *BMC Genomics*, 10, 342.
15. Grande-Garcia A, del Pozo MA. (2008). Caveolin-1 in cell polarization and directional migration. *European Journal of Cell Biology*, 87, 641-7.
16. Griffoni C, Spisni E, Santi S, Riccio M, Guarnieri T, Tomasi V. (2000). Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 756-761.
17. Gustafsson T, Knutsson A, Puntchart A, Kaijser L, Nordqvist AC, Sundberg CJ ve diğ. (2002). Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 444(6), 752-759.
18. Gustafsson T, Puntchart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. (1999). Exercise-induced expression of angiogenesis related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 276, H679-H685.
19. Hang J, Kong L, Gu J-W, Adair TH. (1995). VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 269, H1827-H1831.
20. Hardin CD, Vallejo J. (2006). Caveolins in vascular smooth muscle: form organizing function. *Cardiovascular Research*, 69, 808-815.
21. Harris MB, Starnes JW. (2001). Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 280, 2271-2280.
22. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. (1992). Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiological Reviews*, 72, 369-417.
23. Kim HS, Kim HJ, Kim YS, Park SC, Harris R, Kim CK. (2009). Caveolin, GLUT4 and insulin receptor protein content in human arm and leg muscles. *European Journal of Applied Physiology*, 106(2), 173-9.
24. Kivelä R, Silvennoinen M, Lehti M, Jalava S, Vihko V, Kainulainen H. (2008). Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology*, 7, 13.
25. Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Beliveau R. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Molecular Biology of the Cell*, 14(1), 334-347.

26. Lee YI, Cho YJ, Kim MH, Kim KB, Lee DJ, Lee KS. (2006). Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. *European Journal of Applied Physiology*, 97, 216-224.
27. Liao WX, Feng L, Zhang H, Zheng J, Moore TR, Chen DB. (2009). Compartmentalizing VEGF-induced ERK2/1 signaling in placental artery endothelial cell caveolae: a paradoxical role of caveolin-1 in placental angiogenesis in vitro. *Molecular Endocrinology*, 23(9), 1428-44.
28. Liu J, Wang XB, Park DS, Lisanti MP. (2002). Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 10661-8.
29. Navarro A, Anand-Apte B, Parat MO. (2004). A role for caveolae in cell migration. *The FASEB Journal*, 18, 1801-11.
30. Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA. (2001). Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Developmental Dynamics*, 220, 112-121.
31. Oh YS, Kim HJ, Ryu SJ, Cho KA, Park YS, Park H, ve diğ. (2007). Exercise type and muscle fiber specific induction of caveolin-1 expression for insulin sensitivity of skeletal muscle. *Experimental and Molecular Medicine*, 39(3), 395-401.
32. Pan YM, Yao YZ, Zhu ZH, Sun XT, Qiu YD, Ding YT. (2006). Caveolin-1 is important for nitric oxide-mediated angiogenesis in fibrin gels with human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(12), 1567-1574.
33. Patel HH, Murray F, Insel PA. (2008). Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 359-91.
34. Penumathsa SV, Koneru S, Samuel SM, Maulik G, Bagchi D, Yet SF ve diğ. (2008). Strategic targets to induce neovascularization by resveratrol in hypercholesterolemic rat myocardium: role of caveolin-1, endothelial nitric oxide synthase, hemeoxygenase-1, and vascular endothelial growth factor. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(7), 1027-34.
35. Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SRD, Henry R, Noyszewski EA, Wagner PD. (1999). Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 276, H2247-H2252.
36. Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SRD, Saucedo E, Henry R, Wagner PD. (2000). Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 279, H772-H778.
37. Sonveaux P, Martinive P, DeWever J, Batova Z, Daneau G, Pelat M, ve diğ. (2004). Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circulation Research*, 95(2), 154-61.
38. Suhr F, Brixius K, de Marées M, Böck B, Kleinöder H, Achtzehn S, ve diğ. (2007). Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *Journal of Applied Physiology*, 103(2), 474-83.
39. Takahashi H, Shibuya M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) / VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109, 227-241.
40. Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. (2010). Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 170(1), 16-22.
41. Vasile E, Qu H, Dvorak HF, Dvorak AM. (1999). Caveolae and vesiculovacuolar organelles in bovine capillary endothelial cells cultured with VPF/VEGF on floating Matrigel-collagen gels. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47, 159-67.
42. Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Nagai T, Ogi M, Nomura M, ve diğ. (2003). Vascular endothelial growth factor increases fenestral permeability in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Liver International*, 23, 467-75.