

뒷다리 현수 유도 위축근에 대한 저빈도 전기자극의 VEGF 발현에 미치는 영향

강종호 · 한종만¹

남부대학교 물리치료학과, ¹전남과학대학 물리치료과

Effect of Low Frequency Electrical Stimulation on VEGF Expression of Suspension Induced Atrophic Muscle

Jong-ho Kang, PT, CPO, PhD, Jong-man Han, PT, PhD¹

Department of Physical Therapy, Nambu University

¹Department of Physical Therapy, Chunnam College

<Abstract>

Purpose : The purpose of this experiment was to evaluate the pre-application effect of low frequency electrical stimulation(LFES) on VEGF expression of atrophic muscle and to determine the optimal pre-application period of LFES for prevent muscle atrophy

Methods : Twenty-five adult sprague-dawley rats were randomly assigned to weight bearing group, hindlimb suspension for 14 days group, hindlimb suspension with pre-application of LFES for 14 days group, hindlimb suspension with pre-application of LFES for 11 dsys group and, hindlimb suspension with pre-application LFES for 7 dsys group. 16Hz of Biphasic pulse current was applied to gastrocnemius for 15min per days.

Results : VEGF were decreased expression in HSG groups, whereas VEGF were significantly increased in HS+ES14G, HS+ES11G, HS+ES7G groups

Conclusion : LFES during the hindlimb suspension showed a positive effect in VEGF induction and early application is strongly encourage VEGF induction. This indicated that pre-application of LFES could prevent muscle atrophy.

Key Words : Muscle atrophy, Low frequency electrical stimulation, Vascular endothelial growth factor

I. 서 론

근위축은 정형계 및 신경계 질환에서 흔히 볼 수 있는 문제이며 또한 치료적 처치에 의해서도 유발

교신저자 : 한종만, E-mail: hanjm7101@hanmail.net

논문접수일 : 2010년 03월 31일 / 수정접수일 : 2010년 05월 13일 / 게재승인일 : 2010년 05월 24일

될 수 있다(Dupont Salter 등, 2003). 근위축은 근력을 감소시켜 기능장애를 일으키는 원인이 되므로(Jørgensen 등, 2000) 근위축 개선은 장애를 극복하고 삶의 질을 높이는데 중요한 문제로 자리 잡고 있다(Lynch 등, 2007). 그런데 체중부하와 가동을 다시 실시하여도, 위축된 근육을 정상으로 회복시키는데는 발생시간의 2배 이상의 시간이 요구된다(Desaphy 등, 2005). 이러한 사실은 근위축 발생이 예견될 경우 사후 처치보다 예방적 처치의 필요성을 보여주고 있다.

근위축은 단백질 합성의 감소와 파괴의 증가(Paddon-Jones 등, 2006), 근횡단 면적의 감소(Roberts와 Smith, 1989), 신경근 연결부의 축소(Meredith와 Michael, 2005) 그리고 근육 내 혈관의 퇴행(Kano 등, 2000)과 같은 조직학적 퇴행으로 발생되며, 이와 관련된 IGF-1(insulin-like growth factor), NT-3(neurotrophin-3), VEGF(vascular endothelial growth factor)와 같은 분자생물학적 인자들이 관여하고 있다(Huang과 Reichardt, 2001). 특히 VEGF는 혈관 내피세포에서 유래되는 성장인자로서 조직 내 혈관화를 조절하는 중요한 인자로서(Sandara 등, 2001), 회복과정에서 증가하는 것으로 알려져 있다(Wagatsuma 등, 2006). 따라서 특정 처치를 시행하고 VEGF 발현을 관찰하면 조직 내 회복이 일어났는지 그리고 혈관화를 통해서 일어났는지 유추할 수 있다.

물리치료 영역에서는 근위축을 개선시키는데 전기자극, 자기장자극, 운동치료와 같은 다양한 방법들을 사용하고 있다(Shimada 등, 2006; Yumi 등, 2008). 특히 저빈도 전기자극(low frequency electrical stimulation; LFES)은 세포수준에서 단백질 발현 및 동화작용을 증가시키고(Bayol 등, 2005), 미토콘드리아와 근형질내세망을 보존(Xu 등, 2003)시키는 생물학적 효과를 가지고 있다. 또한 주파수와 강도 그리고 자극기간을 자유롭게 조절할 수 있으므로 질환상태의 근수축을 유도하는데 적합하다. 따라서 위축이 진행되는 상황에서도 관절운동 없이 안전하게 근육을 자극할 수 있어 보조기나 석고를 이용한 고정시 진행되는 동안에도 쉽게 적용이 가능하다(남기원, 2003).

전기자극은 선택할 수 있는 치료 변수(parameter)

가 많아 근위축 개선에 적절한 변수를 선택해야만 효과를 얻을 수 있다. 비록 저빈도 전기자극이 근육의 기능을 개선 및 유지시키는데 효과적이라고 알려져 있지만(Dupont Salter 등, 2003) 전기자극 효과와 자극 변수는 연구자마다 다르게 보고되어 있다. 또한 이러한 선행연구들은 전기특성학적 변화나 조직학적, 형태학적 연구가 대부분일 뿐(Boonyarom과 Inui, 2006; Xu 등, 2003; Canton 등, 1995) 근본적으로 혈관화에 영향을 미치는 VEGF 관련 연구는 부족하다.

따라서 본 연구는 근위축 연구에 신뢰성을 확보하고 있는 뒷다리 현수 동물 모델(Yumi 등, 2008)을 이용해 위축을 일으키고, 위축이 진행되고 있는 실험동물의 뒷다리 근육에 LFES를 기간별 사전 적용하여 혈관화의 지표로 알려져 있는 VEGF 발현을 관찰하고자 한다. 이를 통해 저빈도 전기자극이 근육 내 혈관화를 유도함으로써 위축 지연에 도움이 되는지 그리고 근육 내 혈관화를 유도할 수 있는 최적 자극기간을 알아보아 기초자료를 제시하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 실험 설계

본 연구에서 사용한 실험동물은 생후 9주에서 10주 사이의 Sprague-Dawley(효창사이언스(주), 한국)계 수컷 흰쥐 25마리이다. 실험이 진행되는 동안 수돗물과 고형 사료(수퍼피드(주), 한국)를 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 사육실의 온도와 습도는 24~25℃, 50~60%로 유지하고 12시간의 명암 주기를 제공하였다. 모든 실험동물은 뒷다리 현수를 적용하기 위해 제작된 불투명 플라스틱 재질의 260mm×400mm600mm의 사육장에서 사육하였다.

LFES가 근육 내 혈관화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 자유롭게 사육하여 체중을 부하한 체중부하군(WBG), 14일간 뒷다리 현수 처치한 뒷다리 현수군(HSG), 뒷다리 현수와 동시에 14일간 전기자극한 14일 전기자극군(HS+ES14G), 14일간 뒷다리 현수 중에 11일간 전기자극한 11일 전기자극군

Table 1. Experimental design

Number	Group	WBG	HSG	HS+ES14G	HS+ES11G	HS+ES7G
	Rat		5	5	5	5

WBG : weight bearing group

HSG : hindlimb suspension group

HS+ES14G : low frequency electrical stimulation for 14days during hindlimb suspension

HS+ES11G : low frequency electrical stimulation for 11days during hindlimb suspension

HS+ES7G : low frequency electrical stimulation for 7days during hindlimb suspension

(HS+ES11G), 14일간 뒷다리 현수 중에 7일간 전기 자극한 7일 전기자극군(HS+ES7G)으로 구분하고 25마리의 실험동물을 5마리씩 각 집단에 무작위 배치하였다(Table 1).

2. 뒷다리 현수 모델

뒷다리 현수 모델은 근위축의 영향과 근위축에 대한 치료 효과를 연구하기 위해 널리 이용되는 모델이다(Yumi 등, 2008). 뒷다리 현수를 위해 260mm×400mm×600mm 크기의 불투명 플라스틱 사육장을 제작하고, 바닥에서 높이 500mm 지점에 구멍을 뚫어 현수봉과 현수고리를 설치하였다. 원활한 현수 처치를 위해 실험동물을 럼푼(바이엘코리아(주), 한국)과 케타민(유한양행(주), 한국)을 1:1로 혼합한 마취제로 복강 주사하여 전신 마취하였다. 마취가 확인되면 실험동물의 꼬리를 의료용 테이프로 현수고리에 부착하여 족저부가 바닥에서 3cm 이상 떨어지도록 하였다. 실험동물은 앞다리를 이용하여 사육장을 자유롭게 돌아다닐 수 있다. 2주간의 현수 기간 동안 현수 안정성을 매일 검사하였다.

3. 전기자극 방법

연구에 사용된 기기는 주파수와 강도 선택이 자유로운 저주파 전기자극기(STN-100, 스트라텍(주), 한국)이다. 전기자극은 매일 오후 6시에서 10시 사이에 진행하였다. 원활한 전기자극을 위해 럼푼(바이엘코리아(주), 한국)과 케타민(유한양행(주), 한국)을 1:1로 혼합한 마취제로 복강 주사하여 전신 마취시켜 진행하였다. 전기자극에 사용된 전류는 이상성 펄스파로 주파수는 16Hz이며, 1일 1회 15분씩 적용

하였다. 강도는 근육 수축이 일어나기 직전의 최소 강도를 이용하였고, 지름 2.5mm의 원형도자를 이용하여 뒷다리 양쪽 장딴지근 근복부(Dupont Salter 등, 2003)를 자극하였다. 전기자극 동안 족관절을 중립위로 유지하여 근육의 신장을 통제하였다. 체중 부하군과 뒷다리 현수군도 실험군과 같은 환경을 주기 위하여 전신 마취를 동일하게 실시하였다.

3. 장딴지근 표본제작

럼푼과 케타민을 1:1로 혼합한 마취제를 복강 주입하여 마취하고 전신 마취가 확인되면, 심장을 통해 0.9% NaCl용액을 관류시켜 혈액을 제거하고 다시 pH 7.4의 4% paraformaldehyde를 관류하여 전고정을 실시하였다. 전고정이 완료되면, 수술용 가위와 칼을 이용하여 우측 장딴지근을 분리하였다. 분리된 장딴지근은 pH 7.4의 4% paraformaldehyde 용액에서 24시간 후고정을 실시하였다. 후고정이 완료된 장딴지근은 에탄올(MERCK, 독일)로 탈수하고 자일렌(MERCK, 독일)으로 청명을 실시한 뒤에 파라핀 블록으로 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 미세절단기(Microtome, BRIGHT 5040, USA)로 5µm 두께로 잘라 슬라이드로 제작하였다(남기원, 2003).

4. Vascular endothelial growth factor의 면역 조직 화학법

제작된 슬라이드는 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 증류수에 10분간 수세하고, 메탄올 200ml에 H2O2 1ml를 첨가한 용액에 침수하여 과산화 효소를 제거시켰다. 이후 증류수와 0.01M phosphate buffer에 각각 10분씩 수세하고 VEGF 1차 항체(1:200, rabbit

monoclonal VEGF, Vector Laboratories Inc, 미국)를 처리하고 24시간 반응시켰다. 1차 항체처리가 끝나면 0.01M phosphate buffer에 10분씩 3회 수세하고, 2차 항체(1:25, anti-rabbit IgG, Vector Laboratories Inc, 미국)를 처리해 2시간동안 반응시켰다. 2차 항체처리가 완료되면 0.01M phosphate buffer로 10분씩 3회 수세하고 ABC-kit(Vector laboratorie Inc, 미국)으로 3차 항체 처리하고 1시간 반응시켰다. 항체 처리가 완료된 슬라이드는 0.3% DAB에 5분간 침수시켜 갈색 반응이 일어나게 처리하였다. DAB 처리가 완료되면 증류수로 10분씩 3회 수세하고 크레실 바이올렛 아세테이트(Sigma, 미국)로 대조 염색하고 곧바로 탈수, 청명하고 봉입하였다. 최종 염색 과정이 완료된 조직은 광학 현미경(BX50, Olympus, 일본)과 현미경에 장착된 디지털 카메라(Toshiba, 일본)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

5. Vascular endothelial growth factor 발현의 판독

광학현미경으로 얻은 이미지는 Adobe photoshop CS3 extended를 이용하여 관찰하였다. 발현된 VEGF 수준은 분석 기능을 이용하여 단위 면적당 픽셀(pixel)로 계산하여 양적 데이터로 수치화 하였다.

6. 결과 처리 및 분석 방법

HS+ES14G, HS+ES11G, HS+ES7G, WBG, HSG 사이에서 혈관화의 지표로 알려져 있는 VEGF의 발현 차이가 있는지 알아보기 위하여 이미지 분석에서 획득된 VEGF 픽셀을 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)으로 분석하였다. 일원배치 분산분석에서 유의한 차이가 있을 경우, Duncan 사후검정을 이용하여 각 집단사이의 VEGF 발현 차이를 검정하였다. 유의수준 $\alpha=0.05$ 로 하였다.

III. 연구 결과

2주간 뒷다리 현수 처리로 뒷다리 근육의 위축을 유도하는 동안 실시한 14일, 11일, 7일간의 LFES가 근육 내 혈관화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 VEGF를 면역 조직 화학적 연구로 살펴보았다. 그 결과, WBG와 HSG에서 VEGF 발현이 관찰되었는데(Fig 1A)(Fig 1B), WBG보다 HSG에서 VEGF의 발현이 작았으나 통계적으로는 유의하지 않았다(Table 2)(Fig 2). 뒷다리 현수 기간 동안 전기자극을 실시한 HS+ES14G, HS+ES11G, HS+ES7G에서

Table 2. Comparison of VEGF Expression

Group	단위; pixel(p)					p ¹⁾
	WBG	HSG	HS+ES14G	HS+ES11G	HS+ES7G	
Weight	909±176	707.5±182.6	3001.7±353.1	2737.5±160.9	1899±253.7	p<0.05
D ²⁾	a	a	c	c	b	

1) Analysis with One-way ANOVA
 2) Analysis with Duncan methods
 3) All values are mean ± standard deviation

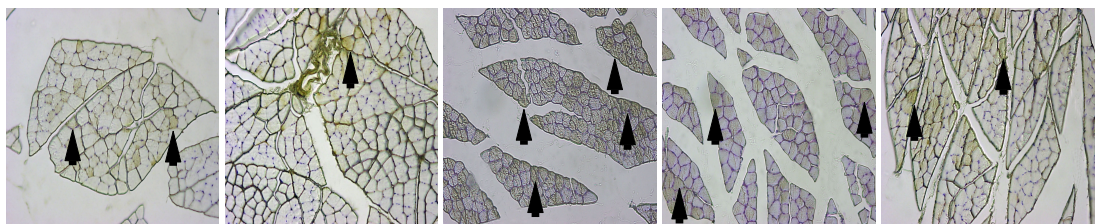
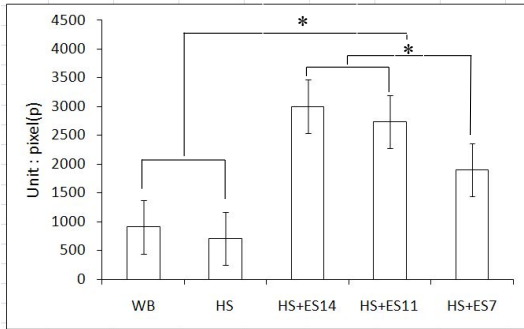


Fig A : WBG, Fig B : HSG, Fig C : HS-ES14, Fig D : HS-ES11, Fig E : HS-ES7
 Arrow: expressed VEGF

Fig 1. VEGF Expression(200x)



* : The VEGF immunoreactivity in each group were significantly different by ANOVA($p < 0.05$)

Fig 2. Comparison of VEGF Expression

VEGF 발현이 관찰되었고(Fig 1C)(Fig 1D)(Fig 1E), WBG와 HSG보다 유의하게 높게 발현되었다(Table 2)(Fig 2). 이것은 저빈도 전기자극이 VEGF 발현을 유도하는데 적합함을 말해준다.

기간에 따른 VEGF의 발현은 HS+ES14G가 가장 높았고 HS+ES7G에서 가장 적었는데(Table 2)(Fig 2), 저빈도 전기자극을 조기에 실시할수록 VEGF 발현을 많이 유도해 낼 수 있었다($p < 0.05$).

IV. 고 찰

전기자극은 신경과 근육의 문제를 해결하기 위해서 사용되는 대표적인 물리치료법으로서, 주파수와 강도, 기간 등을 자유롭게 선택할 수 있어 신경과 근육을 자극하는데 효과적이다(남기원, 2003). 특히 낮은 주파수를 선택하면 위상기간을 증가시켜줄 수 있어 전기적 특성이 변화되어 역치가 증가된 위축 근육을 자극하는데 적절한 치료법이라 할 수 있다(Bruno 등, 2005; Dupont Salter 등, 2003). 본 연구는 위축근을 충분히 자극할 수 있는 위상기간 가진 16Hz의 이상성 펄스파형의 저빈도 전기자극을 선택하여, 위축 지연효과를 살펴보았다.

근육을 위축시키는데 이용되는 동물 모델로는 신경절제(Xu 등, 2003), 석고고정(남기원, 2003), 신경독주입(Dupont Salter 등, 2003), 불용모델(Hurst와 Fitts, 2003)이 있다. 본 연구에서는 부하 제거에 따른 불용성 근위축을 고려하여 근위축 유발에 신뢰성이 입증된 뒷다리 현수 모델(Hurst와 Fitts, 2003)

을 이용하여 연구하였다. 뒷다리 현수 모델은 근육을 재빨리 위축시킬 수 있다.

현수 처치된 근육은 환경에 민감하게 반응하는데, 부하 스트레스가 제거되면 즉시 위축하기 시작하여 급격한 변화를 겪게 된다. 부하 제거 7일 만에 무게의 25%(Thompson 등, 1998), 14일 만에 무게의 33%가 감소되며(Hurst와 Fitts, 2003), 근기능 감소가 7일 이상의 부하 제거 환경에서 나타나기 시작한다(Brown과 Taylor, 2005). 이와 같은 위축은 쉽게 회복되지 않는다. 부하 제거가 길어질수록 회복도 느려지는데, 정상 상태로 돌아가는데 최소한 2배 이상의 회복 기간이 필요하다(Desaphy 등, 2005). 따라서 본 연구는 무게 및 근기능 감소 기간과 회복 기간을 고려하여, 14일간 가자미근 위축을 진행시키는 동안 14일, 11일, 7일의 등 간격으로 전기자극 기간을 설정하여 그 효과를 연구하였다. 그 결과, HS군에서 WB군보다 감소된 VEGF 발현을 관찰할 수 있었다. 이는 14일간의 뒷다리 현수가 근육의 위축 반응을 유도한다는 Hurst와 Fitts, (2003)의 연구와 혈관의 퇴행을 유도한다는 Kano 등(2000)의 연구와도 유사한 결과이다.

근위축 반응은 단백질 합성의 감소(Paddon-Jones 등, 2006), 산화 스트레스 증가(Kondo 등, 1994), 신경연접부의 퇴행(Meredith와 Michael, 2005), 근섬유 변화(D'Antona 등, 2006), 미세소기관의 변화(Nemirovskaia 등, 2005), 기능적 변화를 일으킨다(Brown과 Taylor, 2005). 현재까지 저빈도 전기자극은 이와 같은 위축 반응을 예방하거나 개선시키는데 효과적이라고 보고되고 있다. 저빈도 전기자극은 근섬유형의 변화(Boonyarom 등, 2006), 등척성 강축력의 보존(Ashley 등, 2007), 근무게 보존(Dupont Salter 등, 2003)과 같은 조직학적, 기능적 예방 효과를 보여주고 있는데, 이러한 효과들은 대사효소의 활성화, 수축 단백질의 합성(Bayol 등, 2005), 단백질 동화작용의 증가와 이화작용의 감소(Strasser 등, 2009), 미토콘드리아 및 근형질 내세망 보존(Xu 등, 2003)을 통해서 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한 근육 내 혈관의 적응적 반응이 일어나 혈관 퇴행이 시작되는데, 근육 내 혈관 직경(Kano 등, 2000) 및 혈관비율이 감소될 수 있으며, 근위축이 오래 지속

될 경우에는 무혈관 상태도 발생할 수 있다(Borisov 등, 2000). 이러한 혈관의 퇴행적 반응은 근육의 회복을 방해하게 된다. 따라서 근육이 손상이나 위축에서 회복하는데 필요한 조건 중 하나가 근육 내 충분한 혈관화(angiogenesis)라고 할 수 있다(Ground, 1991). 본 연구에서는 저빈도 전기자극을 위축이 진행중인 가자미근에 14일, 11일, 7일 동안 예방적으로 적용하여 혈관화의 지표로 생각할 수 있는 VEGF 발현을 관찰할 수 있었는데, 신희과정상 선, 후행 인자를 관찰하지는 못하였지만 저빈도 전기자극의 위축 지연 효과가 근육 내 혈관화를 통해 일어난 것이라 유추할 수 있다.

전기자극을 통해서 근육의 위축을 지연시키기 위해서는 적절한 변수를 선택해야할 필요가 있다. Boonyarom 등(2009)이 10Hz와 30Hz의 전기자극의 효과를 비교한 결과, 10Hz만이 효율적이라고 보고하였고 Ashley 등(2007)은 20Hz의 전기자극이 위축 근의 무게를 보존할 수 있었다고 보고하였다. Dupone Salter(2003)은 신경과피 모델에서 4Hz 보다는 2Hz의 전기자극이 좀 더 효과적이라고 보고하기도 하였다. 이와 같은 연구들은 저빈도 전기자극들이 불용성 및 신경성 위축에 효과적임을 보여주는 것이다. 그런데, 신경과피 모델을 이용한 모델에서는 좀 더 짧은 주파수의 전기자극이 효과적이었다. 이것은 탈신경근의 기전류 및 시차가 증가한데 따른 결과로 생각할 수 있다. 본 연구에서는 16Hz의 저빈도 전기자극이 VEGF 발현 시키는 것을 관찰하였는데, 이것은 16Hz의 저빈도 전기자극이 근육의 회복을 도와줄 수 있음을 말하는 것이며(Wagatsuma 등, 2006), 근육에 대한 저빈도 전기자극의 효과가 근육 내 혈관화를 촉진하여 일어났음을 가능성을 보여주는 것이다. 근위축 지연에 효과적인 전기자극 기간은 사용된 위축 모델과 실험 조건에 따라 다른 결과들이 보고되고 있으나(Xu 등, 2003; Boonyarom 등, 2006), 결과적으로 저빈도 전기자극을 적용하는 기간에는 위축 지연효과를 기대할 수 있음을 알 수 있다. 본 연구에서도 선행연구와 유사하게 기간에 관계없이 모든 기간의 전기자극 집단에서 VEGF가 관찰 되었다. 그런데 전기자극의 적용기간을 일찍 할수록 VEGF의 발현이 증가하였는데, 이것은 전기

자극을 조기에 실시할수록 근위축 지연에 효과적임을 보여주는 결과로 생각할 수 있다.

V. 결 론

16Hz의 저빈도 전기자극이 근육 내 VEGF 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해서 실험동물의 뒷다리를 14일간 무부하 처치하면서 조기 전기자극 하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 16Hz의 저빈도 전기자극을 7일, 11일, 14일 조기 적용한 모든 실험 집단에서 VEGF 발현이 유의하게 증가되었다. 또한 조기 적용기간이 짧을수록 VEGF 발현이 많았다. 이와 같은 결과는 16Hz의 저빈도 전기자극을 가능한 일찍 적용할 경우 혈관화를 통한 근위축 지연에 효과적임을 제안하게 해 준다.

참 고 문 헌

- 남기원. 신경근전기자극과 수중운동이 흰쥐 위축근 신경근연접부의 연결재형성에 미치는 영향. 대구대학교 대학원 박사학위 논문. 2003.
- Appell HJ, Duarte JA, Soares JM. Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med.* 1997; 18(3):157-60.
- Ashley Z, Salmons S, Boncompagni S. et al. Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscles of the rabbit hind limb. *J Muscle Res Cell Motil.* 2007;28(4-5):203-7.
- Baldwin KM, Haddad F. Skeletal Muscle Plasticity. Cellular and Molecular Responses to Altered Physical Activity Paradigms. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81:40-51.
- Bayol S, Brownson C, Loughna, PT. Electrical stimulation modulates IGF binding protein transcript levels in C2C12 myotubes. *Cell Biochem. Funct.*, 2005;23(5):361-5.
- Boonyarom O, Inui K. Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol(Oxf).* 2006;188(2):77-89.

- Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec.* 2000; 258(3):292-304.
- Brown M, Taylor R. Prehabilitation and rehabilitation for attenuating hindlimb unweighting effects on skeletal muscle and gait in adult and old rats. *Arch Physic Med and Rehab.* 2005;86(12):2261-9.
- Bruno C, Eric B, Kristina C, et al. Hindlimb unweighting for 2 weeks alters physiological properties of rat hindlimb motoneurons. *J Physiol.* 2005;568(3), 841-50.
- Canton F, Bigard AX, Merino D, et al. Effects of chronic low frequency stimulation on structural and metabolic properties of hindlimb suspended rat soleus muscle. *Eur J Appl Physiol. Occup. Physiol.* 1995;70(6):528-35.
- D'Antona G, Lanfranconi F, Pellegrino MA, et al. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders. *J Physiol.* 2006;570(3):611-27.
- Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, et al. Recovery of the soleus muscle after short- and long-term disuse induced by hindlimb unloading: effects on the electrical properties and myosin heavy chain profile. *Neurobiol Dis.* 2005 Mar;18(2):356-65.
- Dupont Salter AC, Richmond FJ, Loeb GE. Prevention of muscle disuse atrophy by low-frequency electrical stimulation in rats. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2003;Sep;11(3):218-26.
- Ground MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path Res and Prac.* 1991;187(1): 1-22.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Ann Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
- Hudlicka O, Graciotti L, Fulgenzi G, et al. The effect of chronic skeletal muscle stimulation on capillary growth in the rat: are sensory nerve fibres involved? *J Physiol.* 2003;546:813-22.
- Hurst JE, Fitts RH. Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function: protective effect of isometric exercise. *J Appl Physiol.* 2003;95:1405-17.
- Jørgensen L, Crabtree NJ, Reeve J, et al. Ambulatory level and asymmetrical weight bearing after stroke affects bone loss in the upper and lower part of the femoral neck differently: bone adaptation after decreased mechanical loading. *Bone.* 2000;27(5): 701-7.
- Kano Y, Shimegi S, Takahashi H, et al. Changes in capillary luminal diameter in rat soleus muscle after hind-limb suspension, *Acta Physiol Scand.* 2000;169:271-6.
- Kondo H, Nishino K, Itokawa Y. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. *FEBS Lett.* 1994;349:169-72.
- Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, et al. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289:969-80.
- Lynch GS, Schertzer JD, Ryall JG. Therapeutic approaches for muscle wasting disorders. *Pharmacol Ther.* 2007;113(3):461-87.
- Meredith HW, Michael RD. The neuromuscular junction: anatomical features and adaptation to various forms of increased, or decreased neuromuscular activity. *Int J Neurosci.* 2005;115(6):803-28.
- Nagasaka M, Kohzuki M, Fujii T, et al. Effect of low-voltage electrical stimulation on angiogenic growth factors in ischaemic rat skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;.33(7):623-7.
- Nemirovskaia TL, Shenkman BS, Krasnov IB. Effects of long-term hypergravitation on the skeletal muscular tissue in rats. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2005;91(2):113-21.
- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Cree MG, et al. Atrophy and impaired muscle protein synthesis during prolonged inactivity and stress. *J Clin*

- Endocrinol Metab. 2006;91(12):4836-41.
- Qin L, Appell HJ, Chan KM, et al. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. Arch Phys Med Rehabil. 1997;78(5):512-7.
- Roberts D, Smith DJ. Biochemical aspects of peripheral muscle fatigue, Sports Med. 1989;17:125-38.
- Sandara L, Amaral J, Russell R, et al. Angiogenesis Induced by Electrical Stimulation Is Mediated by Angiotensin II and VEGF. Microcirculation. 2001;8:57-67
- Shimada Y, Sakuraba T, Matsunaga T, et al. Effects of therapeutic magnetic stimulation on acute muscle atrophy in rats after hindlimb suspension, Biomed Res. 2006;27(1):23-7.
- Strasser EM, Stättner S, Karner J, et al. Neuromuscular electrical stimulation reduces skeletal muscle protein degradation and stimulates insulin-like growth factors in an age- and current-dependent manner: a randomized, controlled clinical trial in major abdominal surgical patients. Ann Surg. 2009;249(5):738-43.
- Thompson LV, Johnson SA, Shoeman JA. Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats. J Appl Physiol. 1998;84:1937-42.
- Wagatsuma A, Tamaki H, Ogita F. Sequential expression of vascular endothelial growth factor, Flt-1, and KDR/Flk-1 in regenerating mouse skeletal muscle. Physiol Res. 2006;55(6):633-40.
- Xu JG, Tu YQ, Gu YD. Effect of electric stimulation on denervated skeletal muscle atrophy. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2003;17(5):96-9.
- Yumi K, Takeshi N, Katsuya H, et al. Preventive effect of isometric contraction exercise on disuse muscle atrophy using tail suspension mice. J Phys Ther Sci. 2008;(20):39-44.