PROCEEDING BOOK

(Abstracts and Full-Text Papers)

4th INTERNATIONAL EURASIAN CONFERENCE ON SCIENCE, ENGINEERING and TECHNOLOGY

(EurasianSciEnTech 2022)

14 – 16 December 2022
Ankara / Turkey

ISBN 978-605-72134-1-9

EurasianSciEnTech 2022

www.eurasianscientech.org

4th International Eurasian Conference on

Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2022)

December 14-16, 2022 / Ankara, Turkey

www.EurasianSciEnTech.org

PROCEEDING BOOK

(Abstracts and Full-Text Papers)



Editor

Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

Copyright © 2022

ISBN: 978-605-72134-1-9

Publication Date: December 2022

All rights reserved. The right to publish this book belongs to EurasianSciEnTech 2022. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without permission. This Proceeding Book has been published as an electronic publication (e-book). Citation can not be shown without the source, reproduced in any way without permission.

Authors are responsible for the contents of their abstracts and full-text papers.

Congress Web Page

www.eurasianscientech.org

E-mail

info@eurasianscientech.org

Length-weight and length-length relationships of *Vimba vimba* living in Harşit Stream of Gümüşhane Province 1088

Dijital dönüşümün finansal teknolojilere etkileri ve değişen tüketici davranışları 1094

The Effect of Molecular Structure and Reorganization Energy on the Charge Transport Properties of the Pyrazole Molecules 1101

Yerli olarak geliştirilmiş sıcak şekillendirme kalıbı ile üretilen sac parçanın özelliklerinin incelenmesi 1105

K Bant Frekans Modülasyonlu Sürekli Dalga Radarı Tasarımı ve Gerçeklenmesi 1110

Dynamic Vehicle Dispatching Using Parallel Multi Objective Optimization 1118

Benzetim Boya Banyosu Atıksuyunun Fotokatalitik Oksidasyon ile Gideriminde TiO_2 Nanotüplerin Kullanılabilirliğinin İncelenmesi 1124

Novel driving method for thermoelectric cooler modules 1131

Reactive Black 5 Azo Boyarmaddesinin Peroksidisülfat/Isı Sisteminde Gideriminin İncelenmesi 1140

İçten yanmalı motora sahip bir skuter için hibrit güç aktarma sistemi tasarımı 1146

Reactive Black 5 Azo Boyarmaddesinin Peroksimonosülfat/UV Sisteminde Gideriminin İncelenmesi 1154

Kutup tatlı göl suyu örneğinden *Chryseobacterium* sp. EK1'in izolayonu ve karakterizasyonu 1160

Metal işleme yağlarında kullanılan kükürtlü EP ve AW katkı maddelerinin 4 bilye test cihazı ile performans etkilerinin incelenmesi 1165

Numerical investigation of influence of studs on tie bar axial force demands in CPSW/CF 1173

Different Methods Introduced for Modeling Features of 3D Neuroimages in AD Diagnosis: A Systematic Literature Review Study 1181

Fenton prosesi ile Malathion insektisitinin giderimi: Proses optimizasyonu ve toksisite değerlendirilmesi 1193

Enerji ve derivasyon tünellerinde uygulanan farklı gevşetme analiz metotlarının sonuçlarının karşılaştırılması 1199

Numerical Investigation and Design Improvement of Circulation of a Biomass Fuelled Circulating Fluidized Bed Boiler by MFiX-PIC: Secondary Air Inlet Angle 1207

In Silico Transposon Analysis Associated with EBR Treatment in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) 1214

Tissue Specific Gene Expression Analysis of ABC Transporter Gene Family in Different Opium Poppy Cultivars. 1220

Non-invazif pulslu manyetik alan ve pterostilben uygulamasının diyabetik iskelet kası atrofisinde protein sentez yolakları üzerine etkisi 1226

Havacılıkta Kullanılan Faz Dizi Ultrasonik Tekniğinin Teorik İncelenmesi 1238

Bitki su ihtiyacının yer altı su seviyesi değişimine olan etkileri: Konya-Karapınar örneği 1246

Dünya ve Türkiye'de hububatın mevcut durumu ve iklim değişikliğinin hububat üzerine etkisi 1254

➢ *ORAL PRESENTATION*

Non-invazif pulslu manyetik alan ve pterostilben uygulamasının diyabetik iskelet kası atrofisinde protein sentez yolakları üzerine etkisi

Bora TAŞTEKİN [1*] (*ORCID: 0000-0003-0178-8656*), Aykut PELİT[1] (*ORCID: 0000-0003-3916-0207*), Muhammet Batuhan ÇULCU[2], Ali Anıl ÖZTÜRK[3], İnci KURTTAŞ[4]

[*1]Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Adana, Türkiye
[2]Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Balıkesir, Türkiye
[3]Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana, Türkiye
[4]Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Antalya, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: tastekin.bora@gmail.com

Özet

İskelet kas atrofisi, uzun süreli hareketsizlik, yetersiz beslenme, sarkopeni, kronik kalp yetmezliği ve özellikle tip-1 diyabetle birlikte gözlenen kas kütlesinde ve kasılma gücünde azalma olarak ifade edilir. Bu çalışmada diyabetik sıçanların yavaş kasılan iskelet kaslarında meydana gelen atrofide, pulslu manyetik alan (PMA) ve pterostilben (PTS, trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxystilbene) uygulamalarının etkileri çeşitli yönlerden değerlendirildi.

Gruplar, kontrol (K, n=10), diyabet (DM, n=10), diyabet+pterostilben (DM+PTS, n=10), diyabet+pulslu manyetik alan (DM+PMA, n=10), diyabet+pulslu manyetik alan+pterostilben (DM+PMA+PTS, n=10) olarak oluşturuldu. Sıçanlar her gün 2 saat boyunca 10 Hz frekansında 1.5 mT şiddetinde PMA'ya maruz bırakıldı. Pterostilben antioksidanı günlük 30 mg/kg dozda uygulandı. 5 haftalık deney sürecinde haftada bir kez sıçanların kan glukoz seviyeleri ve ağırlıkları ölçüldü. Deney sonunda, dissekte edilen soleus kas preparatlarından biyomekanik kayıtlamalar alınarak kasılma kuvveti yanıtları değerlendirildi. İskelet kaslarında atrofi ve hipertrofi mekanizmalarının düzenlenmesinde ve protein sentez ve yıkımında önemli role sahip olan p-AKT, mTOR, FOXO3a ve insülin konsantrasyon miktarları ELISA yöntemiyle tayin edildi. Atrofinin şiddetine bağlı olarak değişkenlik gösteren toplam protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak tayin edildi. Miyofibriler proteinlerin degradasyonunda etkin olduğu düşünülen Trim63, FBXO32 ve FOXO3a gen ekspresyon analizleri gerçek zamanlı PCR ile yapıldı. Antioksidan ve pulslu manyetik alan tedavisinin birçok hastalık modelinde tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir, fakat bu çalışmada ilk kez diyabetik iskelet kas atrofisi üzerine etkileri ayrıntılı moleküler ve biyomekanik incelemelerle ela alındı. Elde edilen bulgular, diyabetle birlikte bozulan protein sentez yolaklarının antioksidan ve PMA uygulamalarıyla iyileştiğini ve atrofinin şiddetinde azalma sağladığını gösterdi PMA+PTS uygulamasının diğer gruplardan daha çok iyileştirici etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Tip 1 diyabet, iskelet kas atrofisi, pterostilben, pulslu manyetik alan

Effects of non-invasive pulsed magnetic field and pterostilbene application on protein synthesis pathways in diabetic skeletal muscle atrophy

Abstract

Skeletal muscle atrophy is defined as a decrease in muscle mass and contractile strength observed in prolonged immobility, malnutrition, sarcopenia, chronic heart failure, and especially type 1 diabetes. In this study, the effects of pulsed magnetic field (PMF) and pterostilbene (PTS, trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxystilbene) on atrophy of slow-twitch skeletal muscle of diabetic rats were investigated from different aspects.

The groups consisted of control (C, n=10), diabetes (DM, n=10), diabetes+pterostilbene (DM +PTS, n=10), diabetes+pulsed magnetic field (DM +PMF, n=10), diabetes+pulsed magnetic field+pterostilbene (DM +PMF+ PTS, n=10). Rats were exposed to 1.5 mT PMF at a frequency of 10 Hz for 2 hours daily. The antioxidant pterostilbene was administered at a daily dose of 30 mg/kg. During the 5-week experimental period, blood glucose levels and weight of the rats were measured once a week. At the end of the experiment,

biomechanical recordings were carried out from dissected soleus muscle preparations, and the responses to contractile force were evaluated. The levels of p-AKT, mTOR, FOXO3a, and insulin, which play important roles in regulating atrophy and hypertrophy mechanisms and protein synthesis and degradation in skeletal muscle, were determined by ELISA method. Total protein levels, which vary according to the severity of atrophy, were determined by the Bradford method. Analysis of gene expression of TRIM63, FBXO32, and FOXO3a, which are thought to be active in the degradation of myofibrillar proteins, was performed by real-time PCR. It is well known that antioxidant and pulsed magnetic field therapy have been used for therapeutic purposes in many disease models, but this study was the first to investigate their effects on diabetic skeletal muscle atrophy with detailed molecular and biomechanical studies. The results showed that the protein synthesis pathways impaired by diabetes were improved and the severity of atrophy was reduced by the application of antioxidants and PMF. The application of PMA+PTS showed a stronger curative effect than that of the other groups.

Keywords: Type 1 diabetes, skeletal muscle atrophy, pterostilbene, pulsed magnetic field

GİRİŞ

İskelet kası atrofisi ve hipertrofisi, çok sayıda molekülün birbiri ile etkileşim içerisinde olduğu çeşitli sinyal yolaklarının oldukça karmaşık bir iş birliği ile gerçekleşmektedir. İskelet kası protein sentezinde (anabolik) yer alan iki temel sinyal yolağından birisi, pozitif rol oynayan IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR yolağı, diğeri ise negatif düzenleyici rol oynayan myostatin–Smad2/3 yolağıdır. Protein yıkımında (katabolik) etkin olan bir diğer yolak ise TNF-alfa ve NF-kappa B yolağıdır. Anabolik ve katabolik yolaklarda protein sentez ve yıkımını özel çevirim içi sinyal yolları ile etkileyen kilit proteinlerin varlığı uzun zamandır bilinmektedir (Rom ve Reznick, 2016). Bu sebeple birçok çalışmada iyileştirici etkilerinin olduğu düşünülen pulslu manyetik alan (PMA) ve antioksidan (pterostilben) uygulamalarının, metabolik yolaklar üzerindeki hedef protein, gen ekspresyonları ve iskelet kası kasılma kuvvetleri üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

E3 Ubikitin-Proteozom (E3 Ub-P) yolağı üzerinden aktivasyon gösteren Trim 63 ve FBXO32 genlerinin protein yıkımına neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Fanzani, Conraads, Penna, ve Martinet, 2012). Protein degradasyonuna katılan FBXO32 yukarı regülasyonunun katabolik durumlarda Ubikitin-Proteozom (Ub-P) sistemine bağlı kas proteolizinde kritik bir rol üstelendiği ifade edilmiştir (Bodine ve Baehr, 2014). Bazı çalışmalarda, PI3K aktivasyonunun baskılanmasıyla FBXO32 gen ekspresyonunun arttığı gösterilse de, düzenleyici mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Lee ve ark., 2004). Bu çalışmada, Ub-P sisteminde ‘atrogen’ olarak ifade edilen TRIM63ve FBXO32 gen ekspresyonları gerçek zamanlı PCR ile kontrol edildi ve uygulanan yöntemlere bağlı olarak ortaya çıkan değişimler istatistiksel yöntemlerle analiz edildi. Atrofi süresince, FOXO’ların AKT tarafından inhibisyonu yetersiz olursa, aktif FOXO’lar çekirdek içerisine nüfuz ederek TRIM63 ve FBXO32 genlerini etkilemektedir (McKinnell ve Rudnicki, 2004; Zhang ve ark., 2014). Özellikle FBXO32, FOXO3a tarafından aktif hale getirildiğinden [7, 8] çalışmamızda FOXO3a protein derişim tayini ve gen ekspresyon analizleri yapıldı ve FBXO32 gen ekspresyonu ile aralarındaki ilişki değerlendirildi. Fosforile AKT (p-AKT)’nin aktivasyonu ile mTOR aktive ve fosforile olmaktadır (Zanou ve Gailly, 2013); mTOR protein sentezini, p70S6K ve 4E-BP1 üzerinden sağladığından, iskelet kas atrofisinde kilit rollerden olan mTOR protein tayini de bu çalışmada gerçekleştirildi. Daha önceki deneysel diyabetik çalışmamızda, STZ indüklenmiş sıçanların gastroknemius iskelet kaslarının sarkomerik yapılarında bozunmalar ortaya çıktığını ve kasılma yanıtlarında azalma olduğunu gözlemledik (Tastekin ve ark., 2018). Benzer şekilde diğer çalışmalarda da iskelet kası atrofisi ile birlikte kasılma parametrelerinin bozulduğu ve daha erken dönemlerde yorgunluğun görüldüğü yönünde bulgular mevcuttur (Chiu ve ark., 2016; Pelit, Emre, Dagli, ve Tuli, 2013). Deney sonunda, in-vitro olarak biyomekanik kayıtlamalar alındı ve yavaş kasılan iskelet kaslarına ait kasılma parametreleri değerlendirildi.

Çalışmanın hipotezi; son zamanlarda güçlü bir antioksidan olarak ortaya çıkan ve birçok hastalığın araştırılmasında olumlu etkileri gösterilen pterostilben uygulamasının tip 1 diyabetle birlikte bozulan iskelet kası metabolik yolak proteinlerini düzenlemesi yönündeydi. Ayrıca non-invazif PMA uygulamasının kanal kinetiklerini regüle ederek antioksidan etkinliğini artıracağı ve diyabetik atrofide meydana gelen hasarlanmaları iyileştireceği beklendi. Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda diyabetik atrofi konusunda literatüre kapsamlı bir bakış açısı kazandırmak ve olası mekanizmaların birbirleriyle bağlantılarının ayrıntılı bir şekilde incelenmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOD

Deney hayvanları

Bu çalışmada, ağırlıkları 350-400 g arasında değişen Wistar Albino türü 50 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ÇÜTF DETAUM) temin edildi. Hayvanlar tip 2 kafeslerde (363 cm^3) ve her kafeste en fazla 5 hayvan olacak şekilde barındırıldı. Ad-libitum beslenme olarak standart pellet sıçan yemleri ve çeşme suyu kullanıldı. Hayvanların muhafaza edildiği ortam; 12 saat aydınlık-12 saat karanlık, 22-27 ºC sabit sıcaklık ve % 40-60 nem oranına sahip olacak şekilde ayarlandı. Aspiratör yardımıyla ortamda temiz hava değişimi sürekli kontrol edildi.

Deneysel Diyabet Oluşturma

Hayvanlar bulundukları ortama alışmaları için bir hafta müdahale edilmeden beklendi. Daha sonra streptozotosin (STZ, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) indüklenmesi için, kan glukoz seviyeleri ve ağırlıkları not edildi. Hayvanların ağırlıklarına göre 0.1 M soğuk sitrat tamponu (pH=4.6) içerisinde 45 mg/kg/ml STZ homojen çözdürülerek hazırlandı. Sıçanlar anestezi vaporizatörü ile % 60 O_2 ve % 3-4 sevofluran (Abbott, USA) karışımı altında uyutuldu ve kuyruk veninden intra venöz (i.v) olarak hazırlanan STZ'ler uygulandı. STZ yapıldıktan 48-72 saat sonra sıçanların kuyruk venlerinden, glikometre (Accu-Chek Performa Nano, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) yardımıyla kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Kan glukoz seviyeleri ≥16.7mMol/l olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

Pulslu Manyetik Alan Uygulaması

Pulslu manyetik alan, 2r=60 cm çapında, r=30 cm aralığa sahip iki Helmholtz bobini arasında oluşturuldu. Programlanabilir bir sinyal üretecine (ILFA Elektronik, Adana, Türkiye) bağlandığında, bu bobinler üzerinden istenilen frekans ve şiddette manyetik alan çıkışı sağlanabilmektedir. Manyetik alanın pik değeri Hall etkili bir prob yardımıyla manyetik alan ölçmeye yarayan Gausmetre (F.W. Bell Model 6010, Sypris Company, Orlando, FL) ile yapıldı. Zamanla değişen manyetik alanın, 0.5 ms'lik bir yükselme süresi ve 9.5 ms'lik bir düşme süresi ile yarı-üçgen bir dalga formunda olduğu gözlendi. Bobinler arasındaki maksimum indüklenen elektrik alan Faraday yasası kullanılarak hesaplandı. Devredeki akım (I = 5,2 A), güç amplifikatörü ve bobinin çıkışı arasına seri olarak bağlanan bir direnç (0,1 Ω) ile osiloskop üzerinden gözlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Helmholtz bobinleri arasında ölçülen manyetik alanın şekli (sol) ve manyetik alan ölçüm sisteminin genel görünümü (sağ).

Biyomekanik Kayıtlamalar

Kaslar optimum gerginlikte olacak şekilde organ banyosuna yerleştirildi, yaklaşık 30 dakikalık termoregülasyon ve dengelenme süresinden sonra, tek sarsı izometrik kasılma değerleri 0.5 ms (15-20 V) süreli 1 Hz kare pulslarla kaydedildi. Kaslar tekrar kastırılmadan önce 30 dakika dinlenim durumunda kalmalarına izin verildi ve ardından 0.5 ms süreli 100 Hz (15-20 V) frekanslı kare puls uyaranlarla tetanik kasılma yanıtları kaydedildi. Kas uyarılarına karşı elde edilen kuvvet değerlerini kaydetmek için kuvvet çevirici transdüser (FDT 10-A 500 g, Commat, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Kas izometrik kasılma kuvveti (Pt, g-kuvvet), kasılma süresi (CT, ms), gevşeme süresi (RT, ms) ve tetanik kasılma kuvveti (Po, g-kuvvet) gibi kasılma parametreleri kaydedildi.

ELISA ve Bradford Protein Tayini

Sıçanların sağ arka bacaklarından alınan soleus kasları 100-150 mg'lık parçalara ayrıldı, PBS solüsyonu ile temizlendikten sonra eppendorf tüplerinde -80°C'de saklandı. Deney günü, dokular -80°C'den çıkarıldı ve ardından seramik havan ve tokmak yardımıyla hızla toz haline getirildi. Önceden hazırlanan tampon homojenizasyon çözeltisi: 50mM Tris-HCl, pH=7.6, 150mM NaCl, %1 NP -40, %1 sodyum deoksikolat, %0 içeren RIPA tamponu. 1 SDS (Boster Bio, ABD) (w:v, 1:10); fenilmetansülfonil florür (%99, Acros Organics, Belçika) (v:v, 1:100); 1 mM sodyum ortovanadat (%99, Acros Organics, Belçika) (v:v, 1:100); ve 1X proteaz inhibitör kokteyli (Abbkine, ABD) (v:v, 1:100), dokular üzerine eklendi ve steril cam çubuklarla iyice öğütülerek homojenatlar elde edildi. Homojenatlar daha sonra steril eppendorf tüplerine aktarıldı ve 10 dakika boyunca yaklaşık 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjün ardından toplanan süpernatantlar yeni steril tüplere aktarıldı. pAkt, mTOR, FoxO3a ve insülin miktarlarını ölçmek için Bioassay Technology Laboratory (Birmingham, UK) hazır kit ürünleri kullanıldı. Protein konsantrasyonları üretici firmanın talimatlarına göre bir mikroplaka okuyucuda (Multiskan Go, MA, ABD) kaydedildi. Kantitatif numune miktarları, sandviç ELISA protokolü kullanılarak 450 nm'de elde edilen absorbans verilerinden hesaplandı. Toplam protein tayini Bradford çözeltisi (Serva, 5X) ve sığır serum albümini (BSA, pH 7.0, liyofilik, Serva) kullanılarak ölçüldü. Bradford çözeltisinin 5X konsantrasyonu distile su ile 2:7.5 oranında seyreltildi. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için BSA referans çözeltisi distile su ile seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı. Protein tayini için belirlenecek örneklerden 50 µl örnek kuyucuklarına eklendi, daha sonra tüm kuyucuklara 200 µl Bradford çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda okundu.

RNA izolasyonu ve gerçek zamanlı PCR (RT-PCR)

Taze PBS ile saflaştırılan soleus kasları 60 mg'lık eşit parçalara bölünerek steril tüplere yerleştirildi. Ardından 10 kat hacimde (600 µl) RNA geciktirici solüsyonu (Biological Industries, İsrail) eklendi ve tüpler deney gününe kadar -20 °C'de saklandı. RNA izolasyonu için Zymo Research Direct-zol™ RNA Miniprep Plus kiti kullanıldı. İskelet kası dokuları, üreticinin talimatlarına göre kitle birlikte sağlanan TRIZOL reaktifi kullanılarak homojenize edildi; kas dokuları nükleaz içermeyen bir tüpe yerleştirildi ve 800 µl TRIZOL reaktifi eklendi. Örneklerdeki RNA'nın saflığını ve miktarını belirlemek için bir µDrop plaka (Thermo Scientific) kullanıldı. RNA konsantrasyonu ~400-600 µg/ml ve RNA saflık oranı (A260/A280) ~1.7 olarak hesaplandı. Daha sonra toplam 20 µl cDNA, üreticinin protokolüne göre yüksek kapasiteli ters transkripsiyon cDNA kiti (abm Good, Richmond, BC, Kanada) kullanılarak 2 µg RNA örneklerinden sentezlendi. FBXO32, TRIM63 ve FoxO3a gen amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri (Metabion, Almanya) Tablo 1'de listelendi. Verileri normalize etmek için GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) kullanıldı. RT-PCR deneyleri Promega GoTaq® qPCR Master Mix Kit (Promega Corporation, Madison, WI) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri; 1 µl şablon cDNA (1:4), 2 µl ileri ve geri primerler (her biri 10 µM), 10 µl qPCR ana karışımı (1X), 0,2 µl karboksi-X-rhodamin (CXR) referans boyası ve 4,8 µl RNaz içermeyen su ile toplam 20 µl hacimde hazırlandı. Reaksiyon Applied Biosystems® 7500 (Applied Biosystems, Singapur) cihazına belirtilen termal döngü koşulları ayarlanarak gerçekleştirildi: 95 °C'de 1 döngü başlangıç 3 dk denatürasyon, 95 °C'de 40 döngü denatürasyon 15 sn, ve 60 °C'de 1 dk tavlama+uzatma. Döngü eşikleri (C_t) her örnek için otomatik eşik analizi ile belirlendi. Örnekler 3 tekrarlı olarak çalıştırıldı ve gen ekspresyon seviyelerini belirlemek için $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanıldı.

Tablo 1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer dizileri

Primer		Dizilim (5′-3′)
FBXO32	Forward (F)	CCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTT
	Reverse (R)	GCTTCCCCCAAAGTGCAGTA
TRIM63	F	GCTGCCAATCCCTACTGGAC
	R	CATGATCACTTCATGGCGGC
FoxO3a	F	TCTCCCGTCAGCCAGTCTAT
	R	AGTCACTGGGGAACTTGTCG
GAPDH	F	TGCACCACCAACTGCTTA
	R	GGATGCAGGGATGATGTTC

İstatiksel Analiz

Deney gruplarından elde edilen veriler ortalama±standart hata olarak ifade edildi. Normal dağılım testi, Kolmogorov-Simirnov ile yapıldı. Veriler çok yönlü varyans analiz testi (Multivariate Analysis) kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $p<0,05$ değerinde kabul edildi. Analizler IBM SPSS Statistics 20 programında yapıldı. Grafikler Graphpad Prism 8.30 programı ile oluşturuldu.

BULGULAR

Vücut ve Kas Ağırlık Değişimleri

5 haftalık deney süresi boyunca haftada bir kez gruplardaki sıçanların ağırlıkları tartıldı ve ortalama ağırlık ± standart hata (SH) olarak ifade edildi (Tablo 2).

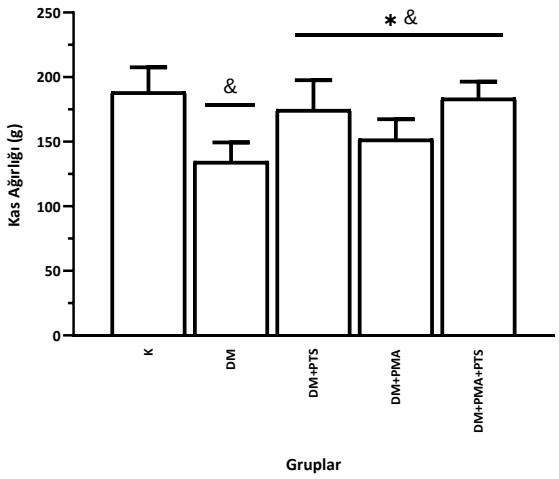
Tablo 2. Deney gruplarındaki hayvanların ortalama ağırlık değişimleri

Deney Grupları (n=10)	Ortalama Ağırlık Değişimleri (g)						
	Haftalar						
	0	1	2	3	4	5	Ortalama±SH
K	400±3,7	395±3,9	403±4,8	410±3,8	415±4,4	422±4,0	408±4,1
DM*	395±9,2	372±9,1	350±10,2	335±9,2	318±9,8	290±9,4	343±9,5
DM+PTS#	390±3,6	372±3,8	370±4,7	375±3,7	383±4,3	394±3,9	381±4,1
DM+PMA#	392±6,2	364±6,6	352±5,7	355±5,5	360±5,8	372±5,9	366±5,9
DM+PMA+PTS#	385±7,8	375±6,8	378±6,9	392±6,7	405±7,0	421±7,4	393±7,2

* K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

5 haftalık deney sonunda, diyabetik sıçanların final vücut ağırlıkları kontrol grubuna göre yaklaşık % 30 azaldı. Pterostilben ve PMA uygulamalarının, DM grubuna kıyasla anlamlı olarak farklılık gösterdiği belirlendi ($p<0,05$).

Deney sonunda sıçanlardan dissekte edilen nemli soleus kas ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü ve istatistiksel olarak gruplar karşılaştırıldı.

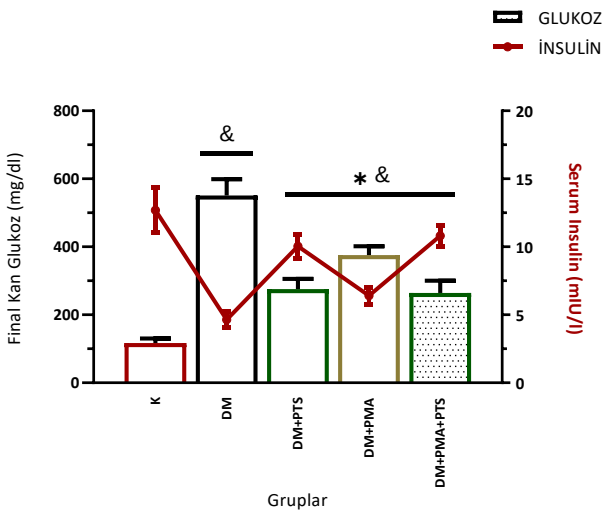


Şekil 2. Deney sonunda soleus kaslarına ait nemli ağırlık değişimleri. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. & K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,001$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,001$).

Soleus kaslarında; DM grubuna göre kas ağırlığında en fazla artış DM+PMA+PTS (% 10,23) grubunda, en az artış DM+PTS (% 3,41) ve DM+PMA (% 3,39) gruplarında gözlendi.

Kan Glukoz ve Serum İnsülin Değerleri

Sıçanların periyodik olarak her hafta sonu kan glukoz seviyeleri glukometre yardımıyla ölçüldü.

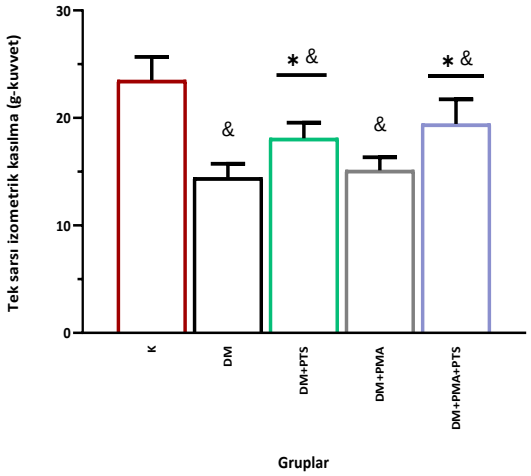


Şekil 3. Deney sonunda gruplara ait ortalama kan glukoz ve serum insülin seviyeleri. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. $^{\&}$ K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

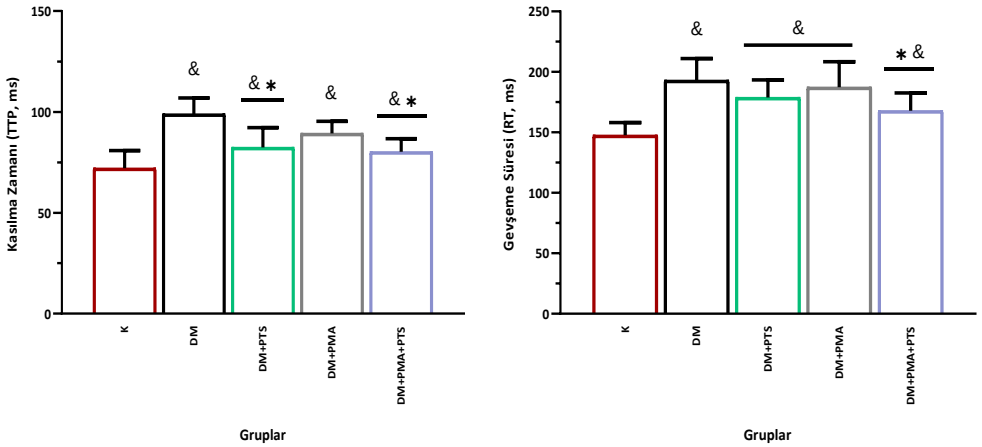
Elde edilen bulgulara göre STZ indüklenmesiyle birlikte DM grubu kan glukoz seviyesi K grubuna göre % 347,32'lik bir artış gösterdi. Diğer grupların DM grubuna göre kan glukoz seviyelerindeki azalma oranı; DM+PTS (% 34,60) > DM+PMA+PTS (% 31,10) > DM+PMA (% 14,63) olarak bulundu. Deney sonunda sıçanların kanlarından analiz edilen serum insülin seviyeleri incelendiğinde, DM grubundaki sıçanların serum insülin değerlerinin K grubuna göre % 57,08 oranında azaldığı görüldü. DM grubuna göre diğer grupların azalan insülin seviyeleri; DM+PMA+PTS (% 135,11) > DM+PTS (% 91,49) > DM+PMA (% 46,81) olarak bulundu.

İzometrik Tek Sarsı Kasılma Kuvvetleri ve Kasılma Parametreleri

Sıçanların soleus kasları çıkarıldıktan sonra organ banyosu içerisinde tek sarsı kasılma yanıtları ve kasılma parametreleri kaydedildi.



Şekil 4. Soleus kaslarındaki tek sarsı (P_t) kasılma kuvvetlerinin gruplara göre değişimi. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. & K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

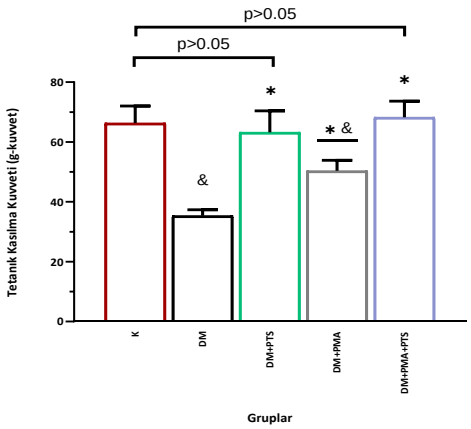


Şekil 5. Soleus kaslarına ait kasılma ve gevşeme sürelerindeki değişimler. TTP, kasılmanın tepe noktasına kadar geçen süreyi; RT, kasılmanın tepe noktasından bitimine kadar geçen süreyi göstermektedir. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. & K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Kontrol grubuna göre diyabetik sıçanların soleus kaslarında kasılma sürelerinin %26,19 oranında uzadığı görüldü. Diyabetle birlikte uzayan kasılma süresi yanıtlarının uygulanan yöntemlerle DM grubuna göre; DM+PMA+PTS (% 7,86) > DM+PTS (% 6,50) > DM+PMA (% 5,24) olarak azaldığı bulundu. Kontrol grubuna göre diyabetik sıçanların soleus kaslarından kayıtlanan gevşeme sürelerinin yaklaşık % 26,90 oranında uzadığı görüldü. Diyabetle birlikte uzayan gevşeme süresi yanıtlarının DM grubuna göre: DM+PMA+PTS (% 13,22) > DM+PTS (% 8,45) > DM+PMA (% 1,89) olarak azaldığı bulundu.

Tetanik Kasılma Kuvvetleri

Tek sarsı kasıma kuvvetleri kayıtlandıktan sonra, 100 Hz frekans, 0.5 ms süre ile 15-20 V uyaranla maksimum kasılma yanıtları (P_0) kaydedildi.

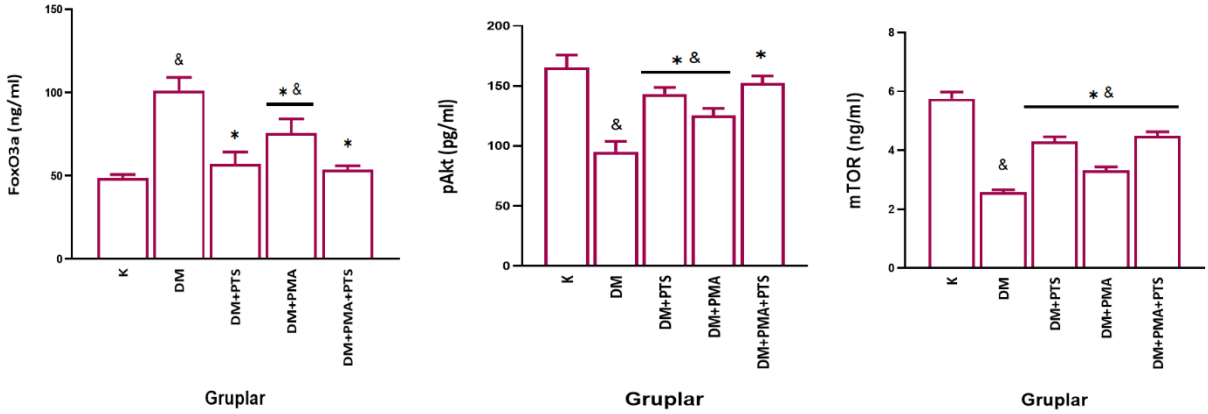


Şekil 6. Soleus kaslarındaki tetanik kasılma (P_0) kuvvetlerinin gruplara göre değişimi. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. & K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Kontrol grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus kaslarında tetanik kasılma kuvvetlerinin % 38,43 oranında azaldığı gözlendi. Pterostilben ve PMA uygulamalarının DM grubuna göre tetanik kasılma kuvvetlerini: DM+PMA+PTS (% 80,83) > DM+PTS (% 74,35) > DM+PMA (% 48,19) olarak artırdığı bulundu.

ELİZA Protein Derişimleri

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların FOXO3a protein derişimlerinin % 62,50 oranında arttığı bulundu. Pterostilben ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus kaslarında en fazla FOXO3a derişim azalmasının DM+PMA+PTS grubunda olduğu görüldü.

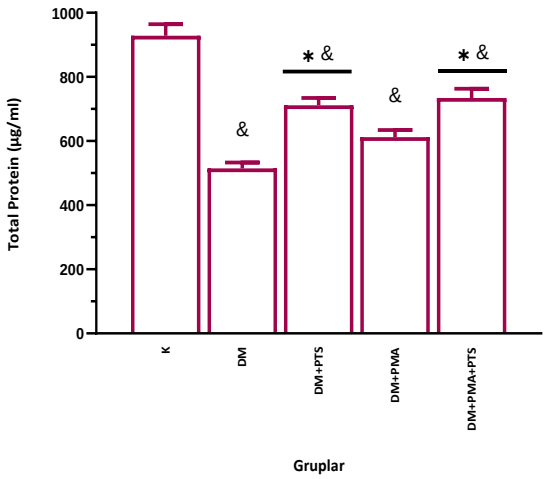


Şekil 7. Soleus kaslarındaki FOXO3a, p-AKT ve mTOR protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. & K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların p-AKT protein derişimlerinin % 37,22 oranında azaldığı bulundu. Pterostilben ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus kaslarında en fazla p-AKT derişiminin % 18,52 artışla DM+PMA+PTS grubunda olduğu görüldü. K grubuna göre DM grubundaki sıçanların mTOR protein derişimlerinin % 57,86 oranında azaldığı bulundu. Pterostilben ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus kaslarında en fazla mTOR derişiminin % 57,54 artışla DM+PMA+PTS grubunda olduğu görüldü.

Bradford Toplam Protein Derişimleri

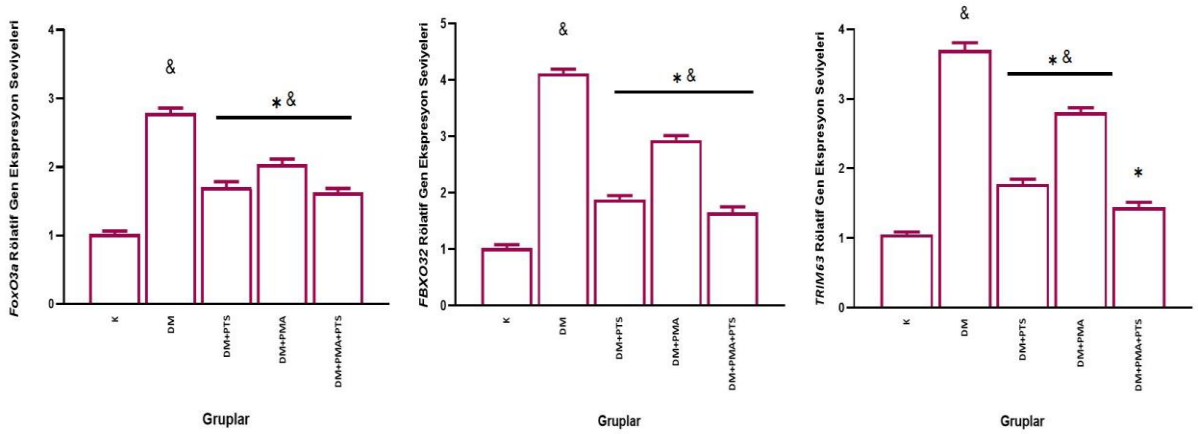
Toplam protein miktarının K grubuna göre DM grubunda % 50,67 oranında azaldığı bulundu. STZ indüklenmesiyle birlikte azalan toplam protein derişiminin DM grubuna göre PMA+PTS uygulamasıyla % 42,49 oranında arttığı görüldü.



Şekil 8. Soleus kaslarındaki toplam protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. & K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Real Time qPCR Gen Ekspresyon Değerleri

FOXO3a, FBXO32 ve Trim 63 gen ekspresyonları incelendi.



Şekil 9. Soleus kaslarında FoxO3a, FBXO32 ve TRIM63 gen ekspresyon katlı değişim değerleri. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. & K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), * DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların FOXO3a gen ekspresyon miktarlarının % 189,11 oranında arttığı bulundu. Pterostilben ve PMA uygulamalarında, DM grubuna göre soleus kaslarında en fazla FOXO3a gen ekspresyon azalmasının % 49.60 ile DM+PMA+PTS grubunda olduğu görüldü K grubuna göre DM grubundaki sıçanların FBXO32 gen ekspresyon miktarlarının % 270,98 oranında arttığı bulundu. Pterostilben ve PMA uygulamalarıyla, DM grubuna göre soleus kaslarında en fazla FBXO32 gen ekspresyon azalmasının % 60,73 ile DM+PMA+PTS grubunda olduğu görüldü. K grubuna göre DM grubundaki sıçanların TRIM63 gen ekspresyon miktarlarının % 276,85 oranında arttığı bulundu. Pterostilben ve PMA uygulamalarıyla, DM grubuna göre soleus kaslarında en fazla TRIM63 gen ekspresyon azalmasının %165,40 ile DM+PMA+PTS grubunda olduğu görüldü.

TARTIŞMA

Tip-1 DM ile birlikte kas büyümesi ve gelişmesi önemli ölçüde bozulmaktadır. Bu durum, azalan kas kütlesi ve kas boyutu, metabolik kontrol yetersizliği ve glikolitik bir fenotipe geçiş ile sonuçlanmaktadır (Andersen, Gadeberg, Brock, ve Jakobsen, 1997; Andersen, Gjerstad, ve Jakobsen, 2004; Fritzsche ve ark., 2008). Kas yapısı ve metabolizmasındaki bu değişiklikler genellikle kas fonksiyonlarındaki azalmalarla ilgilidir (Almeida, Riddell, ve Cafarelli, 2008; Gordon ve ark., 2010; Huttunen ve ark., 1984; Poortmans, Saerens, Edelman, Vertongen, ve Dorchy, 1986). Büyüme ve yapısal fonksiyona ek olarak, kas rejenerasyonu çalışmalarında

belirtildiği gibi, atrofik hasarlanmalar ve tamir mekanizması Tip-1 DM'den olumsuz olarak etkilenmektedir (Gulati ve Swamy, 1991; Krause ve ark., 2013; Krause, Riddell, ve Hawke, 2011). STZ indüklenen Tip-1 DM'li wistar albino erkek sıçanlar (350-400g) üzerinde yapılan bu çalışmada, soleus iskelet kaslarında meydana gelen atrofik mekanizma ve metabolik aktiviteler incelendi. Elde ettiğimiz bulgulara göre, DM grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarının K grubuna göre % 30,41 oranında azaldığı görüldü. PMA+PTS uygulamasının DM'ye göre % 48 vücut ağırlık kaybını önlediği tespit edildi. Bulduğumuz sonuçlar, Manickam ve arkadaşlarının (Manickam, Ramanathan, Jahromi, Chansouria, ve Ray, 1997) STZ ile indüklenmiş sıçanlarda, pterostilben uygulamasının (oral) vücut ağırlık kaybını % 20 önlendiği yönündeki bulgular ile uyumludur. Çalışmamızda ağırlık kaybının daha belirgin önlenmesi, antioksidanların i.p. olarak uygulanmasına bağlanmaktadır.

Enjekte edilebilir insülin kullanımının maliyet ve uygulama zorlukları yanında, Tip-1 DM'li bireylerin yoğun insülin kullanım programlarına katılmaları insüline karşı direnç geliştirebilmektedir (Schechter ve Reutrakul, 2015). Çalışmamızda, DM grubunda artan kan glikoz ve azalan insülin seviyelerinin PTS ve PMA+PTS uygulamalarıyla anlamlı olarak iyileşme gösterdiği bulundu. İnsülin seviyelerindeki iyileşmenin kan glikoz seviyelerindeki iyileşmeden daha etkin görünmesi, GLUT-4 aktivasyonu ve pankreatik beta hücre yenilenmesiyle ilişkilendirilmektedir. Bu yorum daha önce pterostilbenin beta hücre granüllenmesine katkıda bulunduğunu gösteren çalışma ile de desteklenmektedir (Tamaddonfard ve ark., 2013). Elde ettiğimiz biyomekanik kayıtlamalarda, STZ indüklenmesiyle soleus kaslarında % 34,31 oranında tek sarsı kuvvet kaybı olduğu gözlendi. Diyabetik koşullarda kasılma ve gevşeme mekanizması göz önüne alındığında, yavaş kasılan kaslarda, kasılma proteinleri ve Ca^{+2}'nin troponin C'ye bağlanma ilgisinin azalması ile ilişkilendirilebilir (Barclay ve Weber, 2004). Tetanik kasılma yanıtlarına baktığımızda, DM grubuna göre antioksidan ve PMA uygulamalarının anlamlı düzeyde kuvvet artışı sağladığı görüldü. Sonuçlar daha önce Fraysse ve arkadaşlarının soleus ve ekstensor digitorum longus kaslarında Ca^{+2} homeostazisine bağlı olarak gerçekleştirdikleri kuvvet yanıtlarıyla ve Moran ve arkadaşlarının yaşa bağlı olarak yaptıkları araştırmalarla tutarlıdır (Moran, Warren, ve Lowe, 2005).

Tıbbi uygulamalarda kullanılan nutrasötiklerin metabolizma üzerinde çok az yan etkisinin olduğu veya hiç olmadığı düşünülmektedir ve diyabet dâhil birçok patolojik durumda güvenilir kullanımları nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Bacha, Nasir, Iqbal, ve Anjum, 2017). Pterostilben'in nörolojik, kardiyovasküler, metabolik ve hematolojik hastalıklar dâhil olmak üzere çok çeşitli insan hastalıklarında koruyucu ve terapötik özelliklere sahip olduğu ön görülmektedir (Dvorakova ve Landa, 2017). Pterostilben için, 80 sağlıklı gönüllüde 6-8 hafta boyunca yürütülen bir klinik çalışmada (randomize, çift kör ve plasebo kontrollü), pterostilbenin genellikle 250 mg/gün'e kadar olan dozlarda tüketim için güvenli olduğu bildirilmiştir (Riche ve ark., 2013). Pulslu manyetik alan, vücutta nöronları depolarize, repolarize ve hiperpolarize edebilen küçük elektrik akımlarını güvenli bir şekilde indüklediğinden, bu enerjinin canlılar üzerinde yönlendirilmesinin potansiyel olarak nöronal aktiviteyi ve ilgili vasküler yanıtları modüle edebileceği hipotezi öne sürülmüştür (Kavak ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada, 6 hafta boyunca 30 dk./gün, 15 Hz (1.46 mT) uygulanan PMA uygulamasının, STZ indüklenmiş sıçanların vücut ağırlıklarını, kas kuvvetini, kas kütlesini ve insülin seviyelerini artırdığı, diyabetik sıçanların kan glikoz seviyelerinde ise azalma sağladığı ifade edilmiştir (Yang ve ark., 2018).

DM grubunda azalan mTOR seviyesinin PMA+PTS uygulamasıyla anlamlı düzeyde iyileştirildiği görüldü. DM grubuna göre, PMA uygulaması tek başına en az etkiyi bu protein üzerinde göstermiştir. FOXO3a gen ekspresyon analizlerine baktığımızda; DM grubunda artan FOXO transkripsiyon faktörlerinin, diyabetik soleus kaslarında kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görüldü. FBXO32 ve TRIM63 gen ekspresyon analizleri incelendiğinde, pterostilben antioksidanının PMA ile birlikte uygulanmasının daha etkili olduğu görüldü. Bu sonuçlar daha önce Wang ve arkadaşlarının (Wang ve ark., 2018) yaptıkları çalışmalarla uyum göstermektedir. Metti ve arkadaşları da polifenol pterostilben uygulamasının otofaji indüklenmiş iskelet kas miyopatisinde iyileştirici etkileri olduğunu ifade etmiştir (Metti ve ark., 2020).

SONUÇ

Sonuç olarak elde edilen bulgulara göre, pterostilben uygulamasının atrofik sinyal yolaklarını düzenlemede etkili olduğu görüldü. PMA uygulamasının PTS ile kullanımında iyileşmeyi artırıcı yönde etkisinin daha fazla olduğu görüldü. Bu sonuçların diyabetik iskelet kas atrofisi konusunda yapılan farmakolojik araştırmalara, nutrasötik ilaç çalışmalarına ve tıpta alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağına

inanıyoruz. Böylelikle, hastalığın tedavisinde ortaya çıkan ekonomik yükün hafifletilebileceği ve bu yöntemlerin uygulanabilir kolaylığından dolayı da hasta yaşam kalitesi ve bakım yükünün iyileştirilebileceği ön görülmektedir. Daha sonraki çalışmalarda, elektrofizyolojik olarak kanal kinetiklerinin kayıtlanması, elektron mikroskobik ve immünohistokimyasal görüntülemelerin yapılmasıyla anabolik ve katabolik yolakların ayrıntılı incelenmesi planlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Birimi tarafından TSA-2021-13978 nolu proje ile desteklenmiştir. BAP Birimi'ne bu çalışmayı desteklediklerı için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Almeida, S., Riddell, M. C. Cafarelli, E. 2008. Slower conduction velocity and motor unit discharge frequency are associated with muscle fatigue during isometric exercise in type 1 diabetes mellitus. *Muscle Nerve, 37*(2), 231-240.

Andersen, H., Gadeberg, P. C., Brock, B. Jakobsen, J. 1997. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *Diabetologia, 40*(9), 1062-1069.

Andersen, H., Gjerstad, M. D. Jakobsen, J. 2004. Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. *Diabetes Care, 27*(10), 2382-2385.

Bacha, U., Nasir, M., Iqbal, S. Anjum, A. A. 2017. Nutraceutical, Anti-Inflammatory, and Immune Modulatory Effects of beta-Glucan Isolated from Yeast. *Biomed Res Int, 2017*, 8972678.

Barclay, C. J. ve Weber, C. L. 2004. Slow skeletal muscles of the mouse have greater initial efficiency than fast muscles but the same net efficiency. *J Physiol, 559*(Pt 2), 519-533.

Bodine, S. C. ve Baehr, L. M. 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab, 307*(6), E469-484.

Chiu, C. Y., Yang, R. S., Sheu, M. L., Chan, D. C., Yang, T. H., Tsai, K. S., . . . Liu, S. H. 2016. Advanced glycation end-products induce skeletal muscle atrophy and dysfunction in diabetic mice via a RAGE-mediated, AMPK-down-regulated, Akt pathway. *J Pathol, 238*(3), 470-482.

Dvorakova, M. ve Landa, P. 2017. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacol Res, 124*, 126-145.

Fanzani, A., Conraads, V. M., Penna, F. Martinet, W. 2012. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle, 3*(3), 163-179.

Fritzsche, K., Bluher, M., Schering, S., Buchwalow, I. B., Kern, M., Linke, A., . . . Punkt, K. 2008. Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibers are altered in patients with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes, 116*(10), 606-613.

Gordon, C. S., Serino, A. S., Krause, M. P., Campbell, J. E., Cafarelli, E., Adegoke, O. A., . . . Riddell, M. C. 2010. Impaired growth and force production in skeletal muscles of young partially pancreatectomized rats: a model of adolescent type 1 diabetic myopathy? *PLoS One, 5*(11), e14032.

Gulati, A. K. ve Swamy, M. S. 1991. Regeneration of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec, 229*(3), 298-304.

Huttunen, N. P., Kaar, M. L., Knip, M., Mustonen, A., Puukka, R. Akerblom, H. K. 1984. Physical fitness of children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Res, 16*(1), 1-5.

Kavak, S., Emre, M., Meral, I., Unlugenc, H., Pelit, A. Demirkazik, A. 2009. Repetitive 50 Hz pulsed electromagnetic field ameliorates the diabetes-induced impairments in the relaxation response of rat thoracic aorta rings. *Int J Radiat Biol, 85*(8), 672-679.

Krause, M. P., Al-Sajee, D., D'Souza, D. M., Rebalka, I. A., Moradi, J., Riddell, M. C. Hawke, T. J. 2013. Impaired macrophage and satellite cell infiltration occurs in a muscle-specific fashion following injury in diabetic skeletal muscle. *PLoS One, 8*(8), e70971.

Krause, M. P., Riddell, M. C. Hawke, T. J. 2011. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatr Diabetes, 12*(4 Pt 1), 345-364.

Lee, S. W., Dai, G., Hu, Z., Wang, X., Du, J. Mitch, W. E. 2004. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol, 15*(6), 1537-1545.

Manickam, M., Ramanathan, M., Jahromi, M. A., Chansouria, J. P. Ray, A. B. 1997. Antihyperglycemic activity of phenolics from Pterocarpus marsupium. *J Nat Prod, 60*(6), 609-610.

McKinnell, I. W. ve Rudnicki, M. A. 2004. Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell, 119*(7), 907-910.

Metti, S., Gambarotto, L., Chrisam, M., Baraldo, M., Braghetta, P., Blaauw, B. Bonaldo, P. 2020. The Polyphenol Pterostilbene Ameliorates the Myopathic Phenotype of Collagen VI Deficient Mice via Autophagy Induction. *Front Cell Dev Biol, 8*, 580933.

Moran, A. L., Warren, G. L. Lowe, D. A. 2005. Soleus and EDL muscle contractility across the lifespan of female C57BL/6 mice. *Exp Gerontol, 40*(12), 966-975.

Pelit, A., Emre, M., Dagli, K. Tuli, A. 2013. The impact of magnesium on isometric twitch parameters and resting membrane potential of the skeletal muscle in diabetic rats. *Cell Biochem Biophys, 65*(3), 315-319.

Poortmans, J. R., Saerens, P., Edelman, R., Vertongen, F. Dorchy, H. 1986. Influence of the degree of metabolic control on physical fitness in type I diabetic adolescents. *Int J Sports Med, 7*(4), 232-235.

Riche, D. M., McEwen, C. L., Riche, K. D., Sherman, J. J., Wofford, M. R., Deschamp, D. Griswold, M. 2013. Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. *J Toxicol, 2013*, 463595.

Rom, O. ve Reznick, A. Z. 2016. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. *Free Radic Biol Med, 98*, 218-230.

Schechter, R. ve Reutrakul, S. 2015. Management of Severe Insulin Resistance in Patients with Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep, 15*(10), 77.

Tamaddonfard, E., Farshid, A. A., Asri-Rezaee, S., Javadi, S., Khosravi, V., Rahman, B. Mirfakhraee, Z. 2013. Crocin improved learning and memory impairments in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iran J Basic Med Sci, 16*(1), 91-100.

Tastekin, B., Pelit, A., Polat, S., Tuli, A., Sencar, L., Alparslan, M. M. Daglioglu, Y. K. 2018. Therapeutic Potential of Pterostilbene and Resveratrol on Biomechanic, Biochemical, and Histological Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med, 2018*, 9012352.

Wang, D., Sun, H., Song, G., Yang, Y., Zou, X., Han, P. Li, S. 2018. Resveratrol Improves Muscle Atrophy by Modulating Mitochondrial Quality Control in STZ-Induced Diabetic Mice. *Mol Nutr Food Res, 62*(9), e1700941.

Yang, J., Sun, L., Fan, X., Yin, B., Kang, Y., An, S. Tang, L. 2018. Pulsed electromagnetic fields alleviate streptozotocininduced diabetic muscle atrophy. *Mol Med Rep, 18*(1), 1127-1133.

Zanou, N. ve Gailly, P. 2013. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci, 70*(21), 4117-4130.

Zhang, J., Zhuang, P., Wang, Y., Song, L., Zhang, M., Lu, Z., . . . Li, H. 2014. Reversal of muscle atrophy by Zhimu-Huangbai herb-pair via Akt/mTOR/FoxO3 signal pathway in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One, 9*(6), e100918.