

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ YAVAŞ VE HIZLI İSKELET
KASLARI ATROFİSİNDE PULSLU MANYETİK ALAN VE
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bora TAŞTEKİN

**BİYOFİZİK DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Aykut PELİT**

ADANA-2021

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ YAVAŞ VE HIZLI İSKELET
KASLARI ATROFİSİNDE PULSLU MANYETİK ALAN VE
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bora TAŞTEKİN

**BİYOFİZİK DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Aykut PELİT**

Bu Tez, TÜBİTAK tarafından 319S095 nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2021

KABUL VE ONAY

Biyofizik Anabilim Dalı

Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

**“Streptozotosin ile İndüklenmiş Yavaş ve Hızlı İskelet Kasları Atrofisinde Pulsu
Manyetik Alan ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması”**

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi:29/01/2021

TEZ SINAV JÜRİSİ

Doç. Dr. Aykut PELİT
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Işıl ÖCAL
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. H. Ümit Lüleyap
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Zölküf AKDAĞ
Dicle Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Cemil SERT
Harran Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
kabul edilmiştir.

sayılı kararı ile

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez sürecinde, kendisinden her türlü desteği gördüğüm, bilgisi ve tecrübesiyle akademik ve sosyal hayatıma katkıda bulunan, her zaman güvenini hissettirerek bu süreci rahat bir şekilde geçirmemi sağlayan, samimi ve yardımsever tutumlarından dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aykut Pelit'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam ve akademik hayatımda, ihtiyaç duyduğum her an kendisine danışabildiğim, hiçbir zaman yardım ve bilgisini esirgemeyen, içtenlik ve hoş görüsüyle yanımda olan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Işıl Öcal'a teşekkür ederim.

Eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. İsmail Günay'a ve Biyofizik Anabilim Dalı'nın kıymetli Öğretim Üyelerine teşekkür ederim.

Eliza analizleri sırasında her türlü imkân ve desteklerini esirgemeyen, akademik tutumu ve yardımseverliği ile bana örnek olan Sayın Prof. Dr. Serdar Satar'a ve çalışmalarında yardımcı olan, zamanını ayırıp benimle geç saatlere kadar çalışan Arş. Gör. Çağlar Kalkan'a teşekkür ederim.

İmmünohistokimya analizleri için bilimsel ve deneysel katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sait Polat'a ve histolojik görüntülerin kayıtlanmasında yardımcı olan Arş. Gör. Tuğçe Sapmaz'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana güç ve kuvvet veren, iyiliği ve doğruluğu aşılayan, erdemli ve özgüvenli bir birey olmamı öğreten, aile olmanın en temiz ve sıcak halini yaşatan sevgili Annem Kumru Taştekin ve Babam Yaşar Taştekin'e sevgi dolu teşekkür ederim.

Hayatımın anlam bulmasını sağlayan, varlığıyla huzur bulduğum, bana olan eşsiz sevgi ve güveni ile beni güçlendiren ve onurlandıran, sevincimi, üzüntümü, hayallerimi... paylaştığım, beni her halimle bıkmadan, bir an olsun şikayet etmeden anlayan, eğitimim ve doktora tez sürecinde kendinden fedakarlıklar eden, en büyük destekçim, sevgili eşim Tülay Taştekin'e sonsuz teşekkür ederim.

ve Babaannem, adını anmakla bile heyecanlandığım, hayata karşı dimdik duruşu olan, sahip olduğum tüm güzelliklerin mimarı, çocukluğumun en temiz kokusu, özlediğim... Elif Taştekin'e minnetle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1 Diyabetes Mellitus	4
2.1.1 Sınıflandırma ve Teşhis Kriterleri	4
2.1.2 Epidemiyoloji	5
2.1.3 Komplikasyonlar.....	6
2.2 İskelet Kasları	7
2.2.1 İskelet Kası Gelişimi.....	7
2.2.2 İskelet Kası Kinetik Özellikleri	9
2.2.3 Diyabet ve İskelet Kasları	11
2.2.4 Diyabetik İskelet Kası Miyopatisi	11
2.3 Kas Atrofi ve Hipertrofinde Moleküler Mekanizmalar	12
2.3.1 IGF1–PI3K–Akt–mTOR Sinyal Yolağı	14
2.3.2 p70S6K ve 4E-BP1 Protein Sentezi.....	17
2.3.3 Akt-FOXO-MAFbx-MuRF1 Sinyal Yolağı	17
2.3.4 Ubikitin Proteozom Sistemi	18
2.3.5 Myostatin-Smad2/3 Sinyal Yolağı	19
2.3.6 TNF-alfa Katabolik Yolağı	19
2.3.7 GLUT-4 Aktivasyonu.....	20
2.4 Tip-1 Diyabet ve Protein Metabolizması	22
2.5 Antioksidanlar	22

2.5.1	Resveratrol (RSV)	22
2.5.1.1	Resveratrol'ün Biyosentezi	23
2.5.1.2	Resveratrol'ün Emilimi ve Dokulara Taşınması	24
2.5.1.3	Resveratrol'ün Biyolojik Etkileri.....	24
2.5.2	Pterostilben (PTS)	26
2.5.2.1	Pterostilben'in Terapötik Etkileri	27
2.5.2.2	Pterostilben'in Farmakokinetiği.....	28
2.5.3	Manyetik Alan Tarihçesi ve Aday Penceresi	29
2.5.3.1	Pulslu Manyetik Alan Uygulamaları	31
2.5.3.2	Pulslu Manyetik Alan ve DM.....	32
2.5.3.3	Pulslu Manyetik Alan ve İskelet Kası Atrofisi	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1	Deney Hayvanları	34
3.1.1	Deneyisel Diyabet Oluşturma	35
3.1.2	Deney Grupları	35
3.2	Kan Glikoz ve Ağırlık Takibi	37
3.3	Antioksidanların Hazırlanması ve Uygulanması.....	37
3.4	Pulslu Manyetik Alan Uygulaması.....	38
3.5	Performans Testleri.....	40
3.6	Biyomekanik Kayıtlamalar.....	42
3.5.1	Solüsyonların Hazırlanması	42
3.5.2	Soleus ve EDL Kas Preparatlarının Hazırlanması.....	42
3.5.3	Kasılma Yanıtlarının Kaydedilmesi	43
3.7	ELİZA Analizleri.....	44
3.7.1	Doku Homojenizasyonu	44
3.7.2	Bradford Toplam Protein Tayini.....	45
3.7.3	Eliza Platelerin Hazırlanması	46
3.8	Real Time qPCR Analizleri	48
3.8.1	RNA İzolasyonu	48
3.8.2	cDNA Sentezi.....	50

3.8.3	Real Time qPCR Analizler	51
3.8.3.1	$\Delta\Delta C_T$ Metodu	52
3.9	Işık Mikroskopi Yöntemi.....	53
3.10	İmmünohistokimya Analizleri	54
3.11	İstatistiksel Analizler	55
4.	BULGULAR.....	55
4.1	Vücut ve Kas Ağırlık Değişimleri.....	55
4.2	Kan Glikoz ve Serum İnsülin Değerleri	58
4.3	Koşu Bandı Performans Testlerinin Değerlendirilmesi	60
4.4	Biyomekanik Kayıtlamalar.....	61
4.4.1	İzometrik Tek Sarsı Kasılma Kuvvetleri ve Kasılma Parametreleri.....	61
4.4.2	Tetanik Kasılma Kuvvetleri ve Değişik Frekanslarda Kasılmalar	65
4.5	ELİZA Protein Derişimleri	70
4.5.1	Bradford Toplam Protein Derişimleri.....	78
4.6	Real Time qPCR Gen Ekspresyon Değerleri	79
4.7	İstatiksel Dağılım p-Volkan Grafikleri.....	83
4.8	İmmünohistokimya Görüntüleri	85
4.9	Işık Mikroskopi Görüntüleri	93
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	97
6.	KAYNAKÇA.....	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1	KAS LİFLERİNDEN OLUŞAN İSKELET KASI YAPISI.-----	8
ŞEKİL 2.2	ANABOLİK VE KATABOLİK YOLAKLARDAKİ HİPERTROFİ-ATROFİ SİNYAL YOLAKLARI. -----	14
ŞEKİL 2.3	ARJİNİN VE LÖSİN AMİNOASİTLERİNİN MTORC1 ÜZERİNDEKİ ETKİSİ. -----	16
ŞEKİL 2.4	UBİKİTİN PROTEOZOM SİSTEMİ. -----	18
ŞEKİL 2.5	GLUT-4 TRANSLOKASYONUNUN ŞEMATİK GÖSTERİMİ. -----	20
ŞEKİL 2.6	ÇALIŞMADA İZLENEN SİNYAL YOLAKLARININ ŞEMATİK GÖSTERİMİ. -----	21
ŞEKİL 2.7	3,4',5-TRİHYDROXY-TRANS-RESVERATROL VE CİS-RESVERATROL MOLEKÜLER YAPISI. ---	23
ŞEKİL 2.8	3,5-DİMETHOXY-4'-HYDROXYSTİLBENE TRANS-PTEROSTİLBEN VE CİS-PTEROSTİLBEN. --	26
ŞEKİL 2.9	MANYETİK ALAN TERAPİSİ KONUSUNDA, HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANMIŞ MAKALELERE OLAN İLGİ (1985-2012).-----	31
ŞEKİL 3.1	HAYVANLARIN BARINDIRILDIĞI ODA (SOL) VE KAN GLİKOZ ÖLÇÜMÜ (SAĞ) -----	35
ŞEKİL 3.2	DENEY GRUPLARININ ŞEMATİK GÖSTERİMİ.-----	36
ŞEKİL 3.3	ÇALIŞMADA KULLANILAN PTEROSTİLBEN VE RESVERATROL ANTİOKSİDANLARI (SOL) VE HAYVANLARA İ.P. ENJEKSİYON UYGULAMASI (SAĞ).-----	37
ŞEKİL 3.4	HELMHOLTZ BOBİNLERİ ARASINDA ÖLÇÜLEN MANYETİK ALANIN ŞEKLİ (SOL) VE MANYETİK ALAN ÖLÇÜM SİSTEMİNİN GENEL GÖRÜNÜMÜ (SAĞ).-----	39
ŞEKİL 3.5	MANYETİK ALAN UYGULAMA PROTOKOLÜ VE ŞEMATİK GÖSTERİMİ.-----	39
ŞEKİL 3.6	FARADAY KAFES İÇERİSİNDE SIÇANLARA UYGULANAN PULSLU MANYETİK ALAN UYGULAMA SİSTEMİNİN GENEL GÖRÜNÜMÜ.-----	40
ŞEKİL 3.7	KOŞU BANDI SİSTEMİ ŞEMATİK GÖSTERİMİ. -----	41
ŞEKİL 3.8	SIÇAN KOŞU BANDI VE KAYIT SİSTEMİ. -----	42
ŞEKİL 3.9	SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT GÖRÜNTÜLER. -----	43
ŞEKİL 3.10	BİYOMEKANİK KAYIT SİSTEMİ. -----	43
ŞEKİL 3.11	SIVI AZOT İÇERİSİNDE PARÇALANAN KAS DOKUSU. -----	44
ŞEKİL 3.12	BRADFORD PROTEİN TAYİNİ İÇİN YÜKLENEN ELİZA PLATE. -----	45
ŞEKİL 3.13	ELİZA ANALİZLERİNDE KULLANILACAK STOK (REFERANS) SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI. -----	46
ŞEKİL 3.14	ELİZA PLATE OKUYUCU GENEL GÖRÜNÜM (SOL), ABSORBANS ÖLÇÜMÜ İÇİN HAZIRLANAN PLATE (SAĞ). -----	47
ŞEKİL 3.15	KAS DOKULARININ PARÇALANMASI İÇİN KULLANILAN DOKU PARÇALAYICI (SOL) VE TRİZOL İLE MUAMELE SONRASI HOMOJENİZE OLMUŞ KAS DOKUSU (SAĞ).-----	49
ŞEKİL 3.16	REAL TIME QPCR KAYIT SİSTEMİNİN GENEL GÖRÜNÜMÜ. -----	52
ŞEKİL 4.1	DENEY SONUNDA SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT NEMLİ AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİ.-----	56
ŞEKİL 4.2	SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT NEMLİ AĞIRLIK VE VÜCUT AĞIRLIKLARI ORANLARI. -----	57

ŞEKİL 4.3	DENEY SONUNDA GRUPLARA AİT ORTALAMA KAN GLİKOZ VE SERUM İNSÜLİN SEVİYELERİ. -----	58
ŞEKİL 4.4	SIÇANLARIN KOŞU BANDI ÜZERİNDE KALDIKLARI SÜRE BOYUNCA KAT ETTİKLERİ MESAFE DEĞİŞİMLERİ. -----	60
ŞEKİL 4.5	SIÇANLARDA YORGUNLUK GÖRÜLÜNCEYE KADAR GEÇEN SÜRENİN GRUPLARA GÖRE DEĞİŞİMLERİ. -----	61
ŞEKİL 4.6	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ TEK SARSI (P_T) KASILMA KUVVETLERİNİN GRUPLARA GÖRE DEĞİŞİMİ. -----	62
ŞEKİL 4.7	SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT KASILMA SÜRELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER. -----	63
ŞEKİL 4.8	SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT GEVŞEME SÜRELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER. -----	64
ŞEKİL 4.9	K VE DM GRUPLARINDAKİ SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT İZOMETRİK TEK SARSI KASILMA KUVVETLERİ. -----	65
ŞEKİL 4.10	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ TETANİK KASILMA (P_0) KUVVETLERİNİN GRUPLARA GÖRE DEĞİŞİMİ. -----	66
ŞEKİL 4.11	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ P_T/P_0 KUVVET ORANLARININ GRUPLARA GÖRE DEĞİŞİMİ. 67	67
ŞEKİL 4.12	SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT TETANİK KASILMA KUVVETLERİ. -----	67
ŞEKİL 4.13	SOLEUS KASLARINA AİT İZOMETRİK TEK SARSI VE TETANİK KASILMA KUVVETLERİNİN GÖSTERİMİ. -----	68
ŞEKİL 4.14	EDL KASLARINA AİT İZOMETRİK TEK SARSI VE TETANİK KASILMA KUVVETLERİNİN GÖSTERİMİ. -----	68
ŞEKİL 4.15	SOLEUS KASI İÇİN DEĞİŞEN FREKANSLARDA İZOMETRİK KASILMA KUVVETİ YANITLARI. -	69
ŞEKİL 4.16	EDL KASLARI İÇİN DEĞİŞEN FREKANSLARDA İZOMETRİK KASILMA KUVVETİ YANITLARI. -	69
ŞEKİL 4.17	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ FOXO3A PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	70
ŞEKİL 4.18	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ TNF-A PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	71
ŞEKİL 4.19	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ MSTN PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	72
ŞEKİL 4.20	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ CAPN-3 PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	73
ŞEKİL 4.21	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ P-AKT PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	74
ŞEKİL 4.22	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ MTOR PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	75
ŞEKİL 4.23	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ MYHC IIB PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	76
ŞEKİL 4.24	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ GLUT-4 PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	77
ŞEKİL 4.25	SOLEUS VE EDL KASLARINDAKİ TOPLAM PROTEİN DERİŞİMLERİ. -----	78
ŞEKİL 4.26	SOLEUS VE EDL KASLARINDA 4E-BP1 GEN EKSPRESYON KATLI DEĞİŞİM DEĞERLERİ. ----	79
ŞEKİL 4.27	SOLEUS VE EDL KASLARINDA FOXO3A GEN EKSPRESYON KATLI DEĞİŞİM DEĞERLERİ. ---	80
ŞEKİL 4.28	SOLEUS VE EDL KASLARINDA MAFBX GEN EKSPRESYON KATLI DEĞİŞİM DEĞERLERİ. ----	81
ŞEKİL 4.29	SOLEUS VE EDL KASLARINDA MURF-1 GEN EKSPRESYON KATLI DEĞİŞİM DEĞERLERİ. ---	82
ŞEKİL 4.30	DM VE K GRUPLARINDA SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT P-VOLKAN PROTEİN DAĞILIMI. 83	83

ŞEKİL 4.31	DM VE DM+ANT GRUPLARINDA SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT P-VOLKAN DAĞILIMI.--83
ŞEKİL 4.32	DM VE DM+PMA GRUPLARINDA SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT P-VOLKAN DAĞILIMI. -84
ŞEKİL 4.33	DM VE DM+PMA+ANT GRUPLARINDA SOLEUS VE EDL KASLARINA AİT P-VOLKAN DAĞILIMI. -----84
ŞEKİL 4.34	DM VE DİĞER UYGULAMA GRUPLARI ARASINDAKİ P-VOLKAN DAĞILIMI.-----85
ŞEKİL 4.35	KONTROL GRUBUNDA FOXO3A, MURF1 VE FBXO32 İMMUNOREAKTİVİTESİ. -----86
ŞEKİL 4.36	DİYABET GRUBUNDA (DM) FOXO3A, MURF1 VE FBXO32 İMMUNOREAKTİVİTESİ. -----87
ŞEKİL 4.37	DM+PMA UYGULANAN GRUBUN FOXO3A, MURF1 VE FBXO32 İMMUNOREAKTİVİTESİ. 88
ŞEKİL 4.38	DM+R UYGULANAN GRUBUN FOXO3A, MURF1 VE FBXO32 İMMUNOREAKTİVİTESİ.-----89
ŞEKİL 4.39	DM+P UYGULANAN GRUBUN FOXO3A, MURF1 VE FBXO32 İMMUNOREAKTİVİTESİ.-----90
ŞEKİL 4.40	DM+PMA+R UYGULANAN GRUBUN FOXO3A, MURF1 VE FBXO32 İMMUNOREAKTİVİTESİ. 91
ŞEKİL 4.41	DM+PMA+P UYGULANAN GRUBUN FOXO3A, MURF1 VE FBXO32 İMMUNOREAKTİVİTESİ. 92
ŞEKİL 4.42	KONTROL GRUBUNA AİT SOLEUS VE EDL KAS DOKULARININ ENİNE VE BOYUNA KESİTLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.-----93
ŞEKİL 4.43	DİYABET GRUBUNA AİT SOLEUS VE EDL KAS DOKULARININ ENİNE VE BOYUNA KESİTLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.-----93
ŞEKİL 4.44	DM+PMA UYGULANAN GRUBA AİT SOLEUS VE EDL KAS DOKULARININ ENİNE VE BOYUNA KESİTLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.-----94
ŞEKİL 4.45	DM+R UYGULANAN GRUBA AİT SOLEUS VE EDL KAS DOKULARININ ENİNE VE BOYUNA KESİTLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.-----94
ŞEKİL 4.46	DM+P UYGULANAN GRUBA AİT SOLEUS VE EDL KAS DOKULARININ ENİNE VE BOYUNA KESİTLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.-----95
ŞEKİL 4.47	DM+PMA+R GRUBUNA AİT SOLEUS VE EDL KAS DOKULARININ ENİNE VE BOYUNA KESİTLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.-----95
ŞEKİL 4.48	DM+PMA+P GRUBUNA AİT SOLEUS VE EDL KAS DOKULARININ ENİNE VE BOYUNA KESİTLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.-----96

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 3.1	CDNA SENTEZ KİT BİLEŞENLERİNİN HAZIRLANMASI. -----	50
ÇİZELGE 3.2	THERMAL CYCLER CDNA SENTEZ PROTOKOLÜ. -----	50
ÇİZELGE 3.3	MASTER MIX HAZIRLAMA PROTOKOLÜ. -----	51
ÇİZELGE 3.4	REAL TIME QPCR DÖNGÜ PROTOKOLÜ. -----	51
ÇİZELGE 3.5	MRNA GEN EKSPRESYON ANALİZLERİNDE KULLANILAN PRİMERLER. -----	52
ÇİZELGE 3.6	DOKU TAKİBİ İÇİN UYGULANAN PROTOKOL. -----	53
ÇİZELGE 4.1	DENEY GRUPLARINDAKİ HAYVANLARIN ORTALAMA AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİ -----	55
ÇİZELGE 4.2	GRUPLARIN KAN GLİKOZ VE SERUM İNSÜLİN DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI -----	59
ÇİZELGE 4.3	SOLEUS VE EDL KASLARINDA FOXO3A DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	70
ÇİZELGE 4.4	SOLEUS VE EDL KASLARINDA TNF-A DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	71
ÇİZELGE 4.5	SOLEUS VE EDL KASLARINDA MSTN DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	72
ÇİZELGE 4.6	SOLEUS VE EDL KASLARINDA CAPN-3 DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	73
ÇİZELGE 4.7	SOLEUS VE EDL KASLARINDA P-AKT DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. 74	
ÇİZELGE 4.8	SOLEUS VE EDL KASLARINDA MTOR DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	75
ÇİZELGE 4.9	SOLEUS VE EDL KASLARINDA MYHC IIB DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	76
ÇİZELGE 4.10	SOLEUS VE EDL KASLARINDA GLUT-4 DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	77
ÇİZELGE 4.11	SOLEUS VE EDL KASLARINDA TOPLAM PROTEİN DERİŞİMLERİNİN GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRMASI. -----	78
ÇİZELGE 4.12	SOLEUS VE EDL KASLARINDA 4E-BP1 GEN EKSPRESYONLARININ GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI. -----	79
ÇİZELGE 4.13	SOLEUS VE EDL KASLARINDA FOXO3A GEN EKSPRESYONLARININ GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI. -----	80
ÇİZELGE 4.14	SOLEUS VE EDL KASLARINDA MAFBX GEN EKSPRESYONLARININ GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI. -----	81
ÇİZELGE 4.15	SOLEUS VE EDL KASLARINDA MURF-1 GEN EKSPRESYONLARININ GRUPLARA GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI. -----	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DM	Diyabetes Mellitus
STZ	Streptozotosin
PTS	Pterostilben
RSV	Resveratrol
DMSO	Dimetil sülfoksit
PI-3K	Fosfoinozitol 3-kinaz
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
mTOR	Rapamisin'in memeli hedefi
MSTN	Myostatin
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
MuRF-1	Kas yüzük parmağı protein-1
MAFbx	Kas atrofi F kutusu geni
MyHC IIb	Miyozin ağır zincir IIb
CAPN-3	Kalpain-3
HbA1c	Hemoglobin A1c
4E-BP1	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4E-bağlayıcı protein 1
TSC1/2	Tübero skleroz kompleks ½
eIF3F	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 3 alt birimi F
eIF4B	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4B
eIF4E	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4B
eEF2K	Ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz
p70s6K	Ribozomal protein s6 kinaz beta-1
Rheb	Beyinde eksprese ras homologu
ERK1/2	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar 1/2
TRADD	TNF reseptörü tip 1 ile ilişkili ölüm domain proteini
RIP	Reseptör etkileşimli protein
SIRT-1	Sirtuin-1
IKB α	NF kappa B inhibitör alfa
GSK-3 β	Glikojen sentaz kinaz-3 β

ActRIIB	Aktivin reseptör tip-2B
PM	Pterocarpus marsupium
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PARP	Poli adenozin difosfat-riboz polimeraz
ER	Endoplazmik retikulum
IRS	İnsülin reseptör substrat
GLUT-4	Glikoz taşıyıcıları 4
K _{ATP}	ATP duyarlı potasyum kanalı
K ⁺	Potasyum iyonu
Ca _v ⁺²	Voltaj kapılı kalsiyum kanalı
SUR1	Sülfonilüre 1
SR	Sarkoplazmik retikulum
T _p	Troponin
ACh	Asetil kolin
EPSP	Eksite edici post sinaptik potansiyel
SPP	Son plak potansiyel
Na _v ⁺	Voltaja duyarlı sodyum kanalı
AP	Aksiyon potansiyeli
DHPRs	Dihidropiridin reseptörleri
RyR	Riyanodin reseptörleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif substans
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
E3	Ubiquitin bağlayan enzim
PGC1-α	Peroksizom proliferatör ile aktive olan γ-koaktivatör-1
P _i	Yüksek enerjili fosfat
FoxO	Forkhead box O
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
ROS	Reaktif oksijen türleri

$O_2^{\bullet-}$	Süperoksit radikali
O_2	Moleküler oksijen
H_2O_2	Hidrojen peroksit
CAT	Katalaz
GPx	Glutatyon peroksidaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
MDA	Malondialdehit
GST	Glutatyon-S-Transferaz
GRx	Glutatyon redüktaz
nmol	Nano mol
P_t	İzometrik sarsı kuvveti
P_o	Tetanik kuvvet
CT	Kasılma süresi
RT	Gevşeme süresi
TBA	Tiyobarbitürik asit
AhR	Aril hidrokarbon reseptör
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
$NO^{\bullet}$	Nitrik oksit

ÖZET

Streptozotosin ile İndüklenmiş Yavaş ve Hızlı İskelet Kasları Atrofisinde Pulsu Manyetik Alan ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması

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 ve hızlı kasılan iskelet kaslarında meydana gelen atrofide, pulslu manyetik alan (PMA) ve antioksidan (pterostilben (P), trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxystilbene; resveratrol (R), trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) uygulamalarının etkileri çeşitli yönlerden değerlendirildi.

Gruplar, kontrol (K, n=10), diyabet (DM, n=10), DM+P (n=10), DM+R (n=10), DM+PMA (n=10), DM+PMA+P (n=10), DM+PMA+R (n=10) olarak oluşturuldu. Sıçanlar her gün 2 saat boyunca 10 Hz frekansında 1.5 mT şiddetinde PMA'ya maruz bırakıldı. P ve R antioksidanları günlük 20 mg/kg dozda uygulandı. 5 haftalık deney sürecinde haftada bir kez sıçanların kan glikoz seviyeleri ve ağırlıkları ölçüldü. Sıçan iskelet kası performansları koşu bandı testi ile gerçekleştirildi.

Soleus ve ekstensor digitorum longus kas preparatlarından biyomekanik kayıtlar alındı. Dokuların histolojik incelemeleri için immünohistokimya (anti-MuRF1, anti-Atrogin1, anti-Foxo3a) ve ışık mikroskopi görüntüleri elde edildi. İskelet kas dokularında bulunan p-AKT, mTOR, myostatin (MSTN), calpain-3 (CAPN-3), TNF-alfa, GLUT-4, MyHC IIb, FOXO3a ve insülin konsantrasyon miktarları ELISA yöntemiyle tayin edildi. Toplam protein tayini için Bradford yöntemi kullanıldı. Miyofibriler proteinlerin degradasyonunda etkin olduğu düşünülen 4E-BP1, FOXO3a, MuRF-1 ve MAFbx gen ekspresyon analizleri gerçek zamanlı PCR ile yapıldı. Elde edilen bulgular, diyabetle birlikte bozulan protein sentez yollarının antioksidan ve PMA uygulamalarıyla iyileştiği ve atrofinin azaldığını gösterdi. PMA+P uygulamasının diğer gruplardan daha çok iyileştirici etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Pterostilben, resveratrol, diyabetik miyopati, Tip-1 diyabet, iskelet kas atrofisi, pulslu manyetik alan, soleus, EDL

ABSTRACT

The Investigation of Pulsed Magnetic Field and Antioxidant Effects in Slow and Fast Skeletal Muscles Atrophy Induced by STZ

Skeletal muscle atrophy is expressed as a decrease in muscle mass and contraction force observed with prolonged immobility, malnutrition, sarcopenia, chronic heart failure and especially type-1 diabetes. In this study, the effects of pulsed magnetic field (PMA) and antioxidants (pterostilbene (P), trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxystilbene; resveratrol (R), trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) in atrophy occurring in the slow and fast twitch skeletal muscles of diabetic rats were evaluated from various aspects.

Rats were divided into; control (C, n = 10), diabetes (DM, n = 10), DM+P (n = 10), DM+R (n = 10), DM+PMA (n=10), DM+PMA + P (n = 10), DM+PMA+R (n = 10). Rats were exposed to PMA application for 2 hours/day at a frequency of 10 Hz and an intensity of 1.5 mT. P and R antioxidants were administered at a daily dose of 20 mg/kg. The blood glucose levels and weights of the rats were measured once a week during the 5-week experimental period. Rat skeletal muscle performances were performed using the treadmill test.

Biomechanical recordings were obtained from soleus and extensor digitorum longus muscle preparats. Immunohistochemistry (anti-MuRF1, anti-Atrogin1, anti-Foxo3a) and light microscopy images were obtained for histological examination of the tissues. p-AKT, mTOR, myostatin (MSTN), calpain-3 (CAPN-3), TNF-alpha, GLUT-4, MyHC IIb, FOXO3a and insulin concentrations in skeletal muscle tissues were analyzed by ELISA method. 4E-BP1, FOXO3a, MuRF-1 and MAFbx gene expression analyzes, which are thought to be effective in degradation of myofibrillar proteins, were performed by Real Time PCR. The findings showed that the protein synthesis pathways that were disrupted with Type-1 diabetes were improved by antioxidant and PMA applications, and reduced atrophy. It was determined that PMA+P application performed to diabetic rats had more healing effects than other groups.

Key words: Pterostilbene, resveratrol, diabetic myopathy, Type 1 diabetes mellitus, skeletal muscle atrophy, pulsed magnetic field, soleus and EDL

1. GİRİŞ

İskelet kası atrofisi ve hipertrofisi, çok sayıda molekülün birbiri ile etkileşim içerisinde olduğu çeşitli sinyal yollarının 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 diğerk 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 (1). Bu sebeple birçok çalışmada iyileştirici etkilerinin olduğu düşünölen pulslu manyetik alan (PMA) ve antioksidan (pterostilben ve resveratrol) uygulamalarının, anabolik ve katabolik yolaklar üzerindeki hedef protein, gen ekspresyonları ve iskelet kas yapısının morfolojisi üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

E3 Ubikitin-Proteozom (E3 Ub-P) yolağı üzerinden aktivasyon gösteren MuRF-1 ve MAFbx (FBXO32) genlerinin protein yıkımına neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (2). Protein degradasyonuna katılan MAFbx yukarı regölasyonunun katabolik durumlarda Ubikitin-Proteozom (Ub-P) sistemine bağılı kas proteolizinde kritik bir rol üstelendiğı ifade edilmiştir (3). Bazı çalışmalarda, PI3K aktivasyonunun baskılanmasıyla MAFbx gen ekspresyonunun arttığı gösterilse de, düzenleyici mekanizması tam olarak bilinmemektedir (4). Bu çalışmada, Ub-P sisteminde 'atrogen' olarak ifade edilen MuRF-1 ve MAFbx gen ekspresyonları gerçek zamanlı PCR ile kontrol edildi ve uygulanan yöntemlere bağılı olarak ortaya çıkan değışimler istatistiksel yöntemlerle analiz edildi. Atrofi süresince, FOXO'ların AKT tarafından inhibisyonu yetersiz olursa, aktif FOXO'lar çekirdek içerisine nüfuz ederek MuRF-1 ve MAFbx genlerini etkilemektedir (5, 6). Özellikle MAFbx, FOXO3a tarafından aktif hale getirildiğinden (7, 8) çalışmamızda FOXO3a protein derişim tayini yapıldı ve MAFbx gen ekspresyon tayini ile aralarındaki ilişki kontrol edildi.

Ayrıca, MuRF-1 gen düzenlenmesine bağlı olarak değişim gösteren ve kasılmada etkin olan MyHC IIb protein derişimleri tayin edilerek, uygulanan yöntemlerin MuRF-1 gen ekspresyonu ile MyHC IIb üzerindeki karşılaştırmalı etkileri analiz edildi.

Fosforile AKT (p-AKT)'nin aktivasyonu ile mTOR aktive ve fosforile olmaktadır (9); mTOR protein sentezini, p70S6K ve 4E-BP1 üzerinden sağladığından, iskelet kas atrofisinde kilit rollerden olan p-AKT, mTOR ve 4E-BP1 protein tayini de bu çalışmada gerçekleştirildi. Son zamanlarda, anabolik yolak içerisinde negatif düzenleyici rol oynayan miyostatin iskelet kası kütlesinin düzenlenmesinde ve musküler distrofi tedavisinde yeni bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmaktadır (10, 11). Bu çalışmada, miyostatin protein derişimleri de hesaplanarak diyabetik atrofik sürece katkısı ve tüm sürecin etki mekanizması bütünsel bir bakış açısı altında oluşturulmaya çalışıldı.

Kalpainlerin kas atrofisinde görülen proteoliz disregülasyonunda anahtar rol oynadığı ifade edilmektedir (12, 13). Anormal biçimde aktive edilmiş olan Kalpain-3 tarafından (CAPN-3) Ub-P yolağı ve AKT fosforilasyonunun aşağı yönde regüle edildiğı ve kas atrofisinin oluştuğı gösterilmiştir (2). Araştırmacılar, CAPN-3'ün hasar görmüş proteinleri daha kısa segmentlere ayırarak sarkomerden atılımlarını kolaylaştırdığını öne sürmektedir. Bu sayede, E3 Ub ligaz sistemi bölünmüş peptit üzerindeki bir Ub parçasını kovalent olarak bağlayarak ayırık sarkomerik parçaları modifiye edebilmektedir (14). Bu çalışmada, CAPN-3 değişimlerini de analiz ederek moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılması sağlanmaya çalışıldı.

Kas hücrelerinde enerji kaynağı olarak kullanılan glikozun içeri alımının GLUT-4 aktivasyonu ile sağlandığı bilinmektedir (15). Bu yüzden kullanılan yöntemlerin, bir yandan atrofik mekanizma üzerindeki etkileri araştırılmaya çalışılırken diğer yandan metabolik sürekliliğı sağlayacak olan hücresel enerji gereksinimi konusundaki etkileri, iskelet kaslarındaki GLUT-4 aktivasyon analizleri yapılarak araştırıldı. Diyabetik atrofi ile birlikte iskelet kaslarının morfolojilerinde ve miyofibriler yapılarında düzensizlikler ortaya çıkmaktadır. Daha önceki deneysel diyabetik çalışmamızda, sıçanlara STZ indüklendiğinde gastroknemius iskelet kaslarının sarkomerik yapılarında bozunmalar ortaya çıktığını gözlemledik (16).

Yavaş (soleus) ve hızlı (Ekstensor Digitorum Longus, EDL) kasılan iskelet kas dokuları üzerinde gerçekleştirdiğimiz moleküler ve genetik çalışmalara ek olarak ışık mikroskop görüntüleri elde edildi. Ayrıca anti-MuRF1, anti-FBXO32 ve anti-Foxo3a için immünohistokimya görüntülemeleri de yaparak moleküler mekanizmanın miyofibriler/morfolojik yapısını daha ayrıntılı inceleme imkânımız oldu. Yapılan çalışmalarda iskelet kası atrofisi ile birlikte kasılma parametrelerinin azaldığı ve daha erken dönemlerde yorgunluğun görüldüğü yönünde bulgular mevcuttur (17, 18). Biz de çalışmamızda biyomekanik kayıtlamalar yaparak yavaş ve hızlı kasılan iskelet kaslarına ait kasılma parametrelerini değerlendirdik. Ayrıca, diyabete bağlı olarak oluşan kas gücü zayıflıkları ve kullanılan yöntemlerin bu süreçteki gözle görülür etkileri, sıçanların belirli zamanlarda koşu bandı üzerinde performans testlerine tabi tutulmasıyla takip edildi.

Bu çalışmadaki hipotezimiz; güçlü bir antioksidan olarak tercih edilen ve birçok hastalığın araştırılmasında olumlu etkileri gösterilen resveratrol'e alternatif olarak, sahip olduğu moleküler yapısından dolayı pterostilben uygulamasının iyileştirici etkilerinin daha kuvvetli olması yönündedir. Ayrıca uygulanacak olan non-invazif PMA uygulamasının antioksidan etkinliğini artıracığı ve diyabetik atrofide meydana gelen hasarlanmaları iyileştireceği beklenmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda diyabetik atrofi konusunda literatüre kapsamlı bir bakış açısı kazandırmak ve olası mekanizmaların birbirleriyle bağlantılarını ayrıntılı bir şekilde incelemeyi amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Diyabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), genellikle insülin salınımındaki yetersizlik veya insüline karşı direnç olarak, iki farklı patofizyolojik durumu ifade etmede kullanılan bir terimdir. İşlev bozukluğunun altında yatan fizyolojik temeller farklılık gösterse de, kan glikoz seviyelerinin bozulan insülin tepkisine bağlı olarak yükseldiği (hiperglisemi), mikrovasküler, nörolojik ve makrovasküler komplikasyonlara sebep olduğu ortak bir durum söz konusudur. Zamanla bu komplikasyonlar kendilerini genellikle retinopati, nefropati, periferik-otonomik nöropati, aterosklerotik kardiyovasküler ve serebrovasküler rahatsızlıklar olarak ya da iskelet kası atrofisi şeklinde göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde Diyabetes Mellitus'un körlük, böbrek yetmezliği ve travmatik olmayan uzuv amputasyonunun önde gelen nedenleri arasında olduğu, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların gelişme riskini de iki ila yedi kat artırdığı düşünülmektedir (19, 20).

Hastalıkla ilişkili komplikasyonlar arasında, diyabetik iskelet kası atrofisi tarihsel olarak bakıldığında daha az araştırma konusu olmuştur. Bununla birlikte, hem sağlıklı hem de diyabetik popülasyonlarda yaşam boyu sağlıklı bir iskelet kası kütlesini korumanın önemi, son zamanlarda yoğun araştırma çabalarının olduğu bir alan haline geldi (21-24). Diyabetik miyopatide, sağlıklı iskelet kası kütlesini ve işlevini korumanın önemi ergenlik döneminde başlar ve genel metabolik kontrolün iyileştirilmesinde ve dolayısıyla diğer komplikasyonların ilerleme oranının azaltılmasında hayati önem taşır.

2.1.1 Sınıflandırma ve Teşhis Kriterleri

DM genellikle iki etiopatogenetik kategoriye ayrılır; insülin etkisine karşı direnç olduğu ve açlık kan şekerinin yükseldiği Tip-2 DM ve langerhans adacıklarındaki pankreatik beta hücrelerinin otoimmün aracılı tahribatının olduğu insülin sekresyonunun yokluğuna ve dolayısıyla kan şekerinin yükselmesine sebep olan Tip-1 DM (25). Tip-1 DM teşhisinden önce başlayan semptomlar genellikle polidipsi, poliüri, kilo kaybı ve aşırı açlık olarak ifade edilir (26).

Tip-1 DM teşhisi genellikle açlık kan şekeri seviyesinin >7 mmol/L veya normal kan şekeri seviyesinin >11 mmol/L'nin üzerinde olduğu ya da % 6,5 veya daha fazla glikolize hemoglobin içeren (HbA1c) durumlarda görülür (27-29). Tip-1 DM ve Tip-2 DM arasındaki başlıca ayırt edici özelliklerden birisi, beta hücre oto-antijenlerine özgü serolojik oto-antikorların varlığıdır. Tip-1 DM'li bireylerin % 90'ından fazlası, hastalığın başlangıcından aylar veya yıllar önce insülin reaktif (IAA), glutamik asit dekarboksilaz (GADA), insülinoma ile ilişkili oto-antijen 2 (IA2A) veya çinko taşıyıcı 8 (ZnT8A) gibi oto-antikorlardan birine veya daha fazlasına sahiptir (30-32).

Özellikle endişe verici olan, Tip-2 DM'de birincil patoloji durum olan insüline karşı direncin Tip-1 DM'li bireylerde gelişmesi ve bu bireylerin sayısının artmasıdır. Bunun yoğun insülin tedavisi programının, Tip-1 DM'li çoğu kişinin katıldığı, bir sonucu olabileceği hipotezi öne sürülmüştür (33, 34).

2.1.2 Epidemiyoloji

Tip-1 DM, tüm Diyabetes Mellitus vakalarının % 5-15'ini temsil etmektedir ve dünya çapında Tip-1 DM'li 33 milyondan fazla bireyin olduğu tahmin edilmektedir (26, 35). Ayrıca, Tip-2 DM teşhisi konan yetişkinlerin % 5-15'inin, Tip-2 DM ve Tip-1 DM tanılarını ayırt etmedeki zorluklar nedeniyle, gerçekte Tip-1 DM'ye sahip olabileceği ve bu nedenle gerçek Tip-1 DM vaka sayısının olduğundan az tahmin edilebileceği öne sürülmüştür (36). Tip-1 DM, genetik olarak duyarlı bireylerde ergenlik döneminde yaygın olarak geliştiği için juvenil-başlangıçlı diyabet olarak da adlandırılır (26). Bununla birlikte, yaşa özgü insidans oranının bebeklik ve ergenlik arasındaki yıllarda artmasına ve ardından düşme eğiliminde olmasına rağmen, Tip-1 DM hastalarının yaklaşık % 30'unun 20 yaşından sonra teşhis edildiği unutulmamalıdır (37).

Endişe verici bir şekilde, Tip-1 DM insidans oranları küresel ölçekte yıllık olarak istikrarlı bir şekilde artmaktadır; Amerika Birleşik Devletleri, Norveç, Almanya ve Finlandiya'da sırasıyla % 5,3, % 3,3, % 2,6 ve % 2,4 gibi yüksek bir oranda rapor edilmiştir.

T.C Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan 2015 yılı verilerine göre, Türkiye'de 6.095.579 (% 7.7) Tip-2 DM ve 1.017.043 (% 1.3) Tip-1 DM birey olduğu bildirilmiştir (29).

Ayrıca, Tip-1 DM görülme sıklığındaki en önemli artışın çocuklar arasında olduğu göz önünde bulundurulmalıdır; örneğin, Avrupa'da 5 yaşın altındaki çocuklar en büyük artışı yaşamıştır (38). Tip-1 DM insidans tahminleri için mevcut gidişata dayalı olarak, Avrupa'da 5 yaşın altındaki Tip-1 DM çocukların sayısının ilerleyen yıllarda iki katına çıkması beklenmektedir (39).

2.1.3 Komplikasyonlar

Tip 1 diyabetin sebep olduğu komplikasyonlardan dolayı, Tip-1 DM'li hastaların diğer hastalara göre 5-10 kat daha fazla yüksek ölüm riskine sahip oldukları tahmin edilmektedir (34). Tip-1 DM ile ilişkili komplikasyonların çoğu, etiyolojide mikrovasküler veya makrovasküler olarak sınıflandırılır. Tip-1 DM'nin yönetiminde insülin tedavisinin kullanılmaya başlanmasından bu yana, retinopati, nöropati, nefropati ve kardiyovasküler hastalık gibi uzun vadeli komplikasyonlara bağlı morbidite ve mortalitede azalma görülmüştür (20). Tip-1 DM ile ilişkili metabolik düzensizliğin sistemik doğası ve dolayısıyla kronik hiperglisemi son dönem böbrek yetmezliği ve travmatik olmayan uzuv amputasyonu gibi çok sayıda patolojik komplikasyonlara neden olmaktadır (37). Komplikasyonların ilerlemesini hafifletmede sıklıkla yoğun insülin tedavisi uygulanarak sonuç alınmasına rağmen, bu şekilde glisemik kontrolü sürdürmenin dezavantajlarından biri, Tip-1 DM popülasyonlarında gözlenen potansiyel insülin direncinin gelişmesidir (40).

Tip-1 DM'den olumsuz etkilenen birçok organ arasında iskelet kası daha az araştırma konusu olmuştur. İskelet kası, metabolik olarak aktif en büyük organdır, vücudun birincil glikoz deposu ve insülin duyarlılığı ile bazal metabolik hızın merkezinde yer alır. Tip-1 DM iskelet kaslarındaki atrofinin bir ifadesi olarak sayısız işlev bozukluğuna maruz kalan miyopati oluşumunu tetikler (41, 42). Diyabetik miyopati genellikle düşük kas kütlesi, güçsüzlük, azalmış fiziksel ve düzenleyici aktivite ile birlikte bazı histopatolojik, hormonal ve metabolik anormallikler olarak tanımlanır (19, 43). Kas lifi atrofi ve mitokondriyal morfolojik anormallikler gibi patolojik değişiklikler, yakın zamanda teşhis edilmiş Tip-1 DM hastalarında (1-28 hafta süreyle) diyabetik nöropatinin ortaya çıkmasından önce meydana gelebilir, bu da iskelet kasının Tip-1 DM ortamına akut olarak duyarlı olduğunu göstermektedir (42, 44).

Önemli bir kas büyümesi ve gelişimi dönemi olan ergenlikte, Tip-1 DM oluşumunun baskınlığı ile bağlantılı olarak ortaya çıkan diyabetik miyopatinin fiziksel ve fonksiyonel bozukluklara yol açtığı bilinmekte ve ayrıntılı araştırılması önem arz etmektedir. Bu çalışmada, diyabetik miyopatiyi kuvvetlendiren patolojinin ve altta yatan potansiyel moleküler mekanizmaların ayrıntılı bir şekilde tartışması ele alındı.

2.2 İskelet Kasları

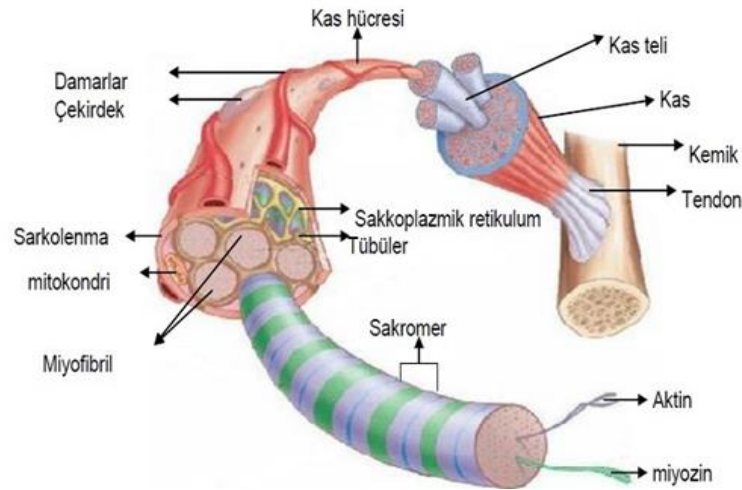
2.2.1 İskelet Kası Gelişimi

İskelet kasları genelde doğumdan önce gelişmeye başlarken diğer kaslar ise doğumdan sonraki birinci yılın sonuna doğru şekillenir. İlk yıldan sonra miyofibriller şekillenerek kas lif çapları ve boyutlarında artma gözlenir. Sağlıklı bireylerdeki kas uzunluk ve genişliği büyüyen iskelet yapısı ile birlikte orantılı olarak gelişmektedir. Aksiyal iskelet, vücut çeperleri, ekstremiteler ve baş kas yapısını somitler ve somitomerler oluşturmaktadır. Oksipital bölgeden kaudale doğru gelişen somitler, skleretom ve dermatom ile birlikte kas oluşturucu 2 bölgeye dallanır. Bunlardan birisi olan somitin dorsolateral bölgesinde, kas düzenleyici faktör olan myoblast belirleme proteini D (MYO-D) bulunmaktadır. Kas oluşumunda gen sıralarını düzenleyen ve transkripsiyon işlevi olarak görev yapan MYO-D proteinleri DNA'nın (Deoksiribonükleik asit) bağlanabileceği bölgelere sahiptir. Lateral plak mezoderminden gelişen kemik morfojenik proteini (BMP-4) ve Fibroblast büyüme faktörü (FGF) genlerinin, nöral yolun dorsolateralinden salınan WNT (Wingless and Int-1) proteinleri aracılığı ile somitin dorsolateral hücrelerini uyarmasıyla MYO-D salınımı gerçekleşmiş olur (45).

Bunlardan ikincisi olan ve somitin dorsomedialde yer alan bölge, dermatomu oluşturan hücre ventraline doğru hareket eder ve miyotomu oluşturur. WNT, kasa özgü başka bir gen olan miyogenik faktör-5'i (MYF-5) uyarır. Uyarılan MYF-5 genleri, epimerik kasların oluşumuna ve hücrel farklılaşma sürecine etki eder. Myogenin ve MYF-5 genlerinin aktive olmasıyla miyotüp ve miyolif oluşumu desteklenmiş olur. Herhangi bir nedenle bu genler baskılanırsa kas oluşumu başarısız olur (46).

Miyotomdan kök alarak oluşan hücreler ilk olarak miyoblastlara (kas hücreleri) farklılaşırlar. Oluşan miyoblastlar birbirlerinden ayrılmadan, peşin sıra mitoz bölünmeler geçirirler ve çok çekirdekli kas liflerini oluştururlar. Bu süreç miyoblastların sıralanması daha sonra Ca^{+2} bağlama bölgesiyle birleşmesi ve sarkoplazmayla birleşimi şeklinde oluşur. Hücreler gelişimlerini devam ettirerek yavaş yavaş silindir halini almaya başlarlar. Bütün bunlar gerçekleşirken insülin benzeri büyüme faktörü'nün (IGF) etkisiyle hücrede yoğun bir şekilde mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ve protein sentezi yapımı gerçekleşir.

Aktin ve miyozini oluşturan, troponin ve tropomiyozin gibi kas kasılmalarında etken proteinler sentezlenir. Sentezlenen proteinler miyofibrillerin içerisine yerleşerek sarkomerin şekillenmesini sağlarlar. İskelet kaslarında belirgin olarak gözlenen çapraz çizgilenmeler, sarkoplazmada miyofibrillerin belirmeye başlamasıyla ortaya çıkar (47).



Şekil 2.1 Kas liflerinden oluşan iskelet kası yapısı.
Hall ve arkadaşlarından modifiye edildi (48).

İskelet kas hücrelerinin oluşumunda çekirdekler, ilk olarak hücrenin ortasına doğru yerleşik haldeyken daha sonra kasılma proteinlerinin orta bölümlere doğru sentezlenmesiyle, sürekli yerleşim yerleri olan sarkolemmanın alt kısımlarına doğru hareket ederler. Bu evrede son aşama olan kas lifine dönüşümün gerçekleştiği ve tam olarak gelişimin miyotüp çekirdeğinin, kenara göç etmesiyle tamamlandığı varsayılır. Bundan sonra kas lifi çekirdeğinde çoğalma (prolifere) gözlenmez fakat kas lifi büyümesinin sürdüğü öngörülmektedir (49).

Erişkin dönemde kas lifinin eksternal laminası ve sarkolemması arasında bulunan satellit (uydu) hücreler kasılabilir proteinleri sentezleyebilecek yapıdadırlar. İskelet kaslarının kendini yenileme özelliği çok iyi gelişmemiş olduğundan hasarlanmalar sonucunda oluşan defektlerde, satellit hücreler kök hücre işlevi görmektedir. Bu hücreler genelde miyoblastları oluşturmak için çoğalırlar. Miyoblastların birbirleriyle birleşmesi ise miyotüpleri ortaya çıkarır ve sonuç olarak kas hücreleri meydana gelmiş olur (49). Kas içerisinde belirli sayıda miyofibril bulunmaktadır.

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesinin bir üyesi olan büyüme ve farklılaştırma faktörü-8 (GDF-8, miyostatin) kas normal boyuta ulaşınca aktive olmaya başlar ve kas büyümesi sonlandırılır. Kas hücreleri mitoz bölünme geçirmediğinden sayılarında artış gözlenmez fakat sarkomer sayılarının artmasıyla uzunlamasına ve miyofibril senteziyle de çap genişlemesi şeklinde enlemesine gerçekleşir (50, 51).

2.2.2 İskelet Kası Kinetik Özellikleri

Üç tür kas vardır: (a) İskelet kası, (b) Düz kas ve (c) Kalp kası. Kas-iskelet sisteminin önemli bir bileşeni olan iskelet kasları, vücut ağırlığının % 40'ını oluşturan en büyük doku kütesidir (52). İstemli sinir sistemi kontrolü altındadırlar ve organizmanın çevresi ile hareketinden ve etkileşiminden sorumludurlar [52]. İskelet kasının temel yapısal birimi kas lifidir. Kas lifleri, plazma zarı olan sarkolemma ile çevrilidir. Her bir lif, hücrenin çevresinde yer alan çok sayıda çekirdek içerir. Bir hücre, golgi aygıtı, sarkoplazmik retikulum, çoklu mitokondri ve lipid damlacıkları, glikojen ve miyoglobin içeren bir sarkoplazma içerebilir (52). Sarkomerler, A bandı (kalın ve örtüşen filamentler), I bantları (ince filamentler), Z bandı (bitişik sarkomerleri bağlayan) içeren kasın temel kasılma birimleridir. Sarkomerin A bandındaki aktin ve miyozin filamentleri arasındaki etkileşim, kas kasılmasından sorumludur (53). Motor ünitelerinin hareket için ihtiyaç duyduğu kasılmayı sağlarlar. Bir motor ünitesi, tek bir alfa motor nöron, aksonu ve innerve ettiği kas liflerinden oluşur (54). Tip I lifler, Tip II liflere göre daha yavaş kasılır-gevşer, tetanik yanıt oluşturmak için daha düşük elektriksel uyarı frekanslarına ihtiyaç duyar ve boyutları daha küçüktür.

Tip I lifler daha fazla miyoglobine sahiptirler ve oksijenli solunumdan sorumlu sitokrom oksidaz sisteminin artan aktivitesi ile daha yüksek miktarda oksijen tutarlar. Tip II lifler bu sistemden yoksundur ve glikojen kaynakları kullanan oksijensiz solunumda daha etkilidirler (52).

Soleus kası, ayak bileğinde ayağın plantar fleksiyonunu sağlar ve topuk kemiği üzerindeki tibiayı sabitleyerek öne doğru salınımı sınırlar. Soleus kasında tip I lifler baskındır, bu da onları hızlı atrofiye yatkın hale getirir. Kas fizyolojisi çalışmalarında yavaş kasılan bir kas modeli olarak kullanılır. Ekstensor digitorum longus (EDL) kası, tibianın lateral kondilinde bulunur ve ayak parmaklarını uzatır. Esas olarak sıçanlarda ve insanlarda Tip 2 liflerden oluşur. Memelilerin iskelet kaslarını oluşturan 7 temel lif tipi vardır. Bunlar en yavaştan en hızlıya doğru sıralanacak olursa; Tip I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAB ve IIB olarak kategorize edilmektedir (55). Bu sınıflandırma, ATP'den enerji salınımını katalizlemede en hızlı olan Tip-2B lifleri ile ifade edilen miyozin tipine ve çapraz-köprü döngüsü boyunca hareketli miyozin başlarına dayandırılır (56, 57). Daha hızlı kasılan kas lifi tiplerinde hücre içi Ca^{+2} kaynaklarının, sarkoplazmik retikulumun, yoğun bir dağılımı vardır. Bu durum kas kasılması ve gevşemesini tetiklemek için gerekli olan Ca^{+2} salınım ve geri alınımının daha hızlı olmasına olanak sağlar. Buna karşın daha yavaş kasılan kas lifi tiplerinde sarkoplazmik retikulum seyrekتر. Bu olay ise daha yavaş kasılma kinetiklerine sebep olan daha yavaş Ca^{+2} salınım ve geri alınımına yol açmaktadır. Aynı zamanda hızlı ve yavaş liflerin kas kasılması için gerekli enerjiyi üretmede (ATP) kullandıkları metabolik yollar da farklıdır. Yavaş kas lifleri glikoz-glikojen'den ATP üretmek için büyük ölçüde oksijenli mitokondriyal yolu, daha az bir ölçüde ise yağ asitlerini kullanır. Hızlı lifler ise büyük bir çoğunlukla ATP üretimi için oksijensiz solunumu kullanırlar. Bunun sonucunda da yavaş kasılan kaslara kıyasla daha beyaz görünürler ve daha az miyoglobin içerirler (58).

2.2.3 Diyabet ve İskelet Kasları

Kas lifi tiplerine ve dağılımlarına göre, DM'nin iskelet kaslarının elektriksel ve kasılabilme özellikleri üzerine etkileri farklılık göstermektedir (59). Soleus kası; % 84 Tip-1, % 16 Tip-2A , % 0 Tip-2B liflerinden, EDL kası; % 3 Tip-1, % 57 Tip-2A ve % 40 Tip-2B liflerinden oluşurken, gastrocnemius kası ise ~% 50 Tip-1, ~% 50 Tip-2 liflerinden oluşmaktadır. Tip-2A liflerinin, Tip-2B liflerine göre daha fazla çevresel koşullara adapte olabilmesi, dış faktörlerden daha az etkilenmesini sağlar (60, 61). Oksidatif stres kaynaklı DM, bu sebepten Tip-2B liflerinin büyüklüklerinde azalmaya sebep olur. Kas liflerinde meydana gelen hasarlanmalar sonucunda Tip-2B lifleri, Tip-2A liflerine göre daha çabuk atrofiye uğrarlar. Bu durum kas boyunun değişmesine sebep olmaktadır. Kas lifi tiplerindeki değişimlere baktığımız zaman hızlı kasılan kas liflerindeki kontraktıl değişimler yavaş kasılan liflere göre daha fazla olmaktadır (62, 63).

2.2.4 Diyabetik İskelet Kası Miyopatısı

Daha önce belirtildiği gibi, diyabetik miyopati tipik olarak kas kütlesinde azalma, kas güçsüzlüğü, azalan fiziksel kapasite ve azalan maksimum güç üretimi ile karakterize edilen bir durumdur (19, 42, 64-66). Diyabetik miyopatide ortaya çıkan azalmış kas kütlesi ve kuvvet üretiminin kas lifi atrofisi ile ilişkili olduğu görülmektedir; hızlı glikolitik lifler (MyHC IIx, IIb) ciddi şekilde etkilenirken, yavaş lifler nispeten daha az etkilenirler (67-71). Tip-1 DM'li çocukların, diyabetik olmayan çocuklara kıyasla motor ünite sayısı tahminlerinin (MUNE) azaldığı bulunmuştur, bu da diyabetik miyopati ilerlemesinde nöropatinin olası rolünü göstermektedir (59). Diyabetik miyopati yüksek MSTN ve Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) seviyeleri ile kas liflerinin düzenleyici kapasitesini düşürerek uydu hücre aktivasyonunu ve alımını olumsuz yönde etkilemektedir (72, 73). Bu nedenle, diyabetik miyopatinin, kolektif olarak fonksiyonel ve fizyolojik sonuçlara katkıda bulunan sayısız fonksiyon bozukluklarını bünyesinde barındırdığı oldukça açıktır. İskelet kası hareketliliğin sağlanması, birincil glikoz düşürücü ve metabolik düzenleyici olarak hizmet etmekten sorumlu olduğundan, altta yatan patolojik mekanizmaları araştırmak ve antioksidan benzeri terapötik ajanların veya non-invazif müdahale stratejilerinin belirlenmesi, diyabetik miyopatiye bağlı komplikasyonların ilerlemesini azaltmak için çok önemlidir.

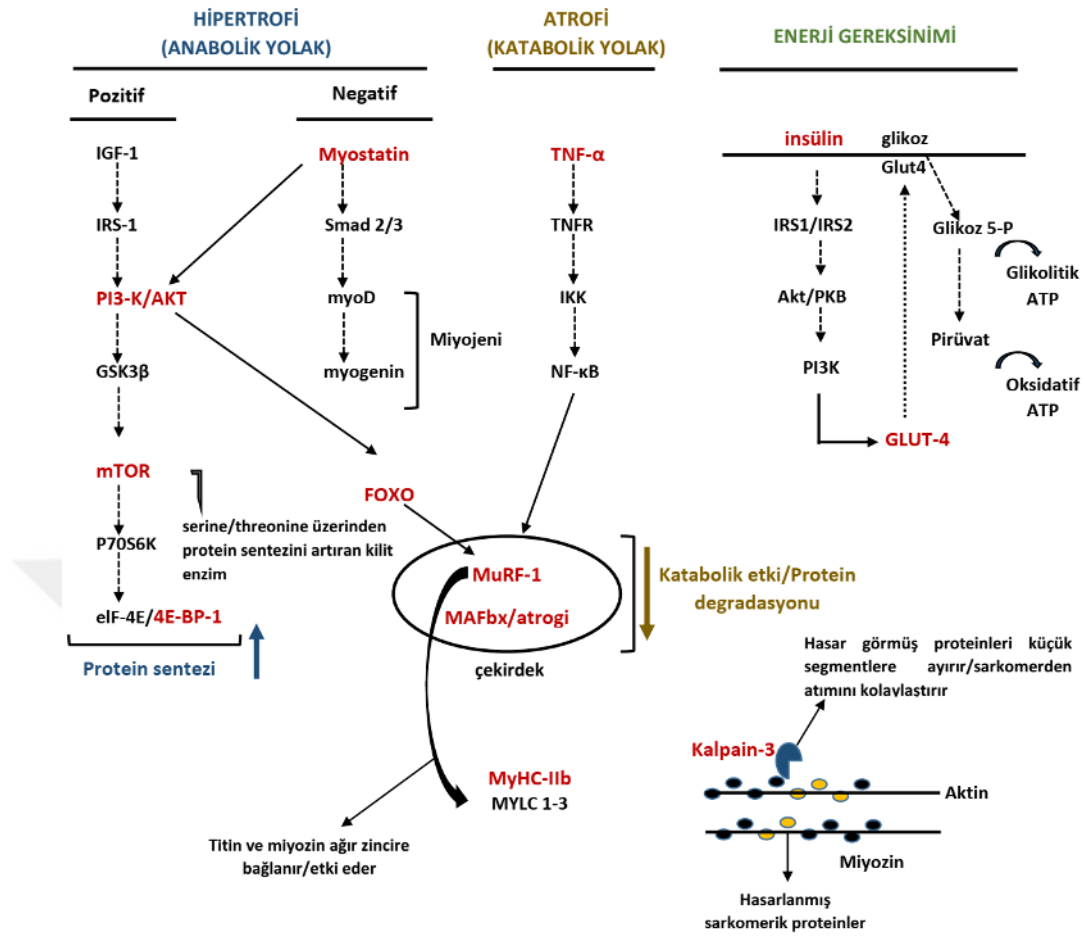
Ayrıca, Tip-1 DM en çok çocuklarda ve ergenlerde teşhis edildiğinden ve iskelet kası çocukluk/ergenlik döneminde önemli gelişme ve büyüme gösterdiğinden, diyabetik miyopati ile ilişkili işlev bozukluklarını önlemeye erken müdahale kritik önem taşımaktadır (42). Alloxan veya STZ indüklenmiş diyabetik fareler ve sıçanlar gibi hayvan modellerinin kullanımı, diyabetik miyopatinin tüm iskelet kası ve tek tek lifler üzerindeki etkisine ilişkin zengin bilgiler sunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, STZ indüklenmiş sıçanlarda, kaslara özgü kuvvet kaybı olduğu gösterilmiş; soleus veya yavaş kasılan liflerin güçlerinde az bir kayıp gözlenirken, EDL veya hızlı kasılan liflerde daha fazla bozulmuş kuvvet üretimi olduğu tespit edilmiştir (67, 68, 74). Pankreasın % 90'lık kısmı çıkartılarak oluşturulan bir başka diyabetik sıçan modelinde, 8 haftalık diyabetten sonra hem tip I hem de II liflerin sırasıyla ~% 25 ve ~% 45 daha az alan kapladığı görüldü. Gastrocnemius-plantaris-soleus kas kütlelerinde % 45 kayıp olduğu ve önemli ölçüde daha düşük mutlak kuvvet üretiminin olduğu bulunmuştur (75). İskelet kaslarında atrofi; sinirsel aktivitenin yavaşlaması, yetersiz beslenme, yaşlanma, diyabet, hareketsizlik, inflamatuvar sitokinlerinin sayısında artma gibi stres faktörlü sebeplerle kendini göstermektedir (76). Bu durum hastalık süreçlerinin uzaması, yaşam kalitesinin düşmesi ve ölüm oranlarının artması gibi olumsuzluklara neden olur (77).

Yorgunluk ve kas zayıflığı, alt ekstremitte kas atrofilerinde görülen ilk belirtilerdendir (78). Sıçanlarla ilgili yapılan çalışmalarda, arka bacaklarında oluşturulan atrofi ile ilk zamanlarda protein sentez miktarı azalırken, daha sonraları sentez hızı sabit olup yıkım hızı artmaktadır (79).

2.3 Kas Atrofi ve Hipertrofisinde Moleküler Mekanizmalar

Protein anabolizma ve katabolizmasındaki dengesizlikler hem protein sentezi hem de bozunma aktivitesinde değişikliklere sebep olmakta, kas kütlesinin dinamik yapısını bozmakta ve muhtemelen diyabetik miyopati durumuna katkıda bulunmaktadır. İnsülinin varlığı ya da yokluğu, Tip-1 DM kasında protein sentezi ve proteoliz arasındaki denge üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (80-82). Daha önce elde edilen bulgulara göre, insülinin Tip-1 DM'de protein sentezini arttırmak yerine proteolizi inhibe etmede aktif rol oynadığı belirtilmektedir (4, 42, 83).

Bu durum insan ve hayvan deneylerinde farklılıklar göstermekte, insülinin STZ indüklenmiş diyabetik sıçanlarda artmış protein sentezi oranını uyardığı, ancak Tip-1 DM'li insan erişkinlerinde ve ergenlerde aynı etkiyi göstermediği bildirilmiştir (84-86). Bununla birlikte, kültürlenmiş C2C12 miyotüplerinde, insülin ve IGF-1 ilavesinin protein sentezini sırasıyla % 62 ve % 35 artırdığı, ancak bu sonuçların in vitro ve in vivo modellerde bazı doğal farklılıklar sergileyebileceği ifade edilmiştir (87). İnsülin ve IGF-1'in her ikisinin de kas büyümesi ve hipertrofi ile güçlü bir şekilde ilişkili sinyal yolağı olan fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)-Akt-mTOR fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağladığı görülmektedir (87, 88). PI-3K sinyal yolunun insülin tarafından aktivasyonu, ubiquitin-ligaz atrogin-1'i inhibe eder, dolayısıyla ubiquitin ekspresyonunu ve proteolitik ubiquitin-proteazom (Ub-P) yolunu negatif olarak düzenler (4, 89). Ub-P proteolitik yolunun bileşenlerinin sıklıkla Tip-1 DM'de yukarı regüle edilmesi, diyabetik miyopatide yaygın olarak gözlemlenen atrofik duruma karşılık gelir (4, 42, 90-92). İlginç bir şekilde, STZ indüklenmiş sıçanlarda AKT ekspresyonu ve aktivasyonunun kontrollere kıyasla hızlı kaslarda yavaş kaslara göre daha düşük olduğu bulunmuştur ve bu durum diyabetik miyopatide liflere özgü atrofinin başka bir yönünü gösterebilir (42, 93). Özellikle yorulabilir glikolitik (Tip IIB) lifler, en şiddetli atrofiyi sergilemektedir. Glikolitik liflerin yüksek miyozin ATPaz aktivitesi ve kısalma hızı yoluyla en fazla gücü ürettiği düşünüldüğünde, bu liflerin atrofisinin tüm kas düzeyinde güç üretimi kaybına yol açması gerektiği sonucu çıkarılabilir (42).



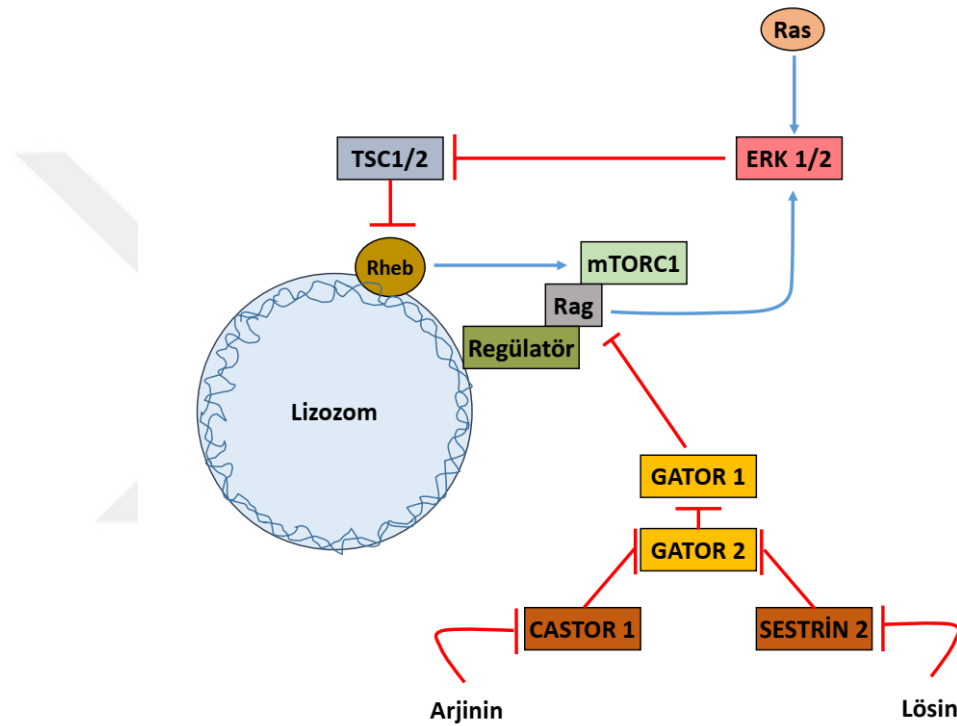
Şekil 2.2 Anabolik ve Katabolik yollardaki hipertrofi-atrofi sinyal yolları. Kırmızı ile yazılanlar bu çalışmada incelenen proteinlerdir.

2.3.1 IGF1–PI3K–Akt–mTOR Sinyal Yolağı

Kas hipertrofisi genellikle anabolik yolak üzerinden protein sentez artırımı olarak gerçekleşirken, kas atrofisi katabolik yollar üzerinden protein degradasyonuna uğrama şeklinde gerçekleşir. Anabolik yolak incelendiğinde pozitif ve negatif düzenleyici sinyal yolları olmak üzere iki alt yolak halinde olduğu görülür (Şekil 2.2). Hücre dışından gelen IGF-1, kendi özel reseptörüne bağlanarak PI3-K'yi aktive eder, aktive olan PI3-K fosforilasyonla PIP₂-PIP₃ dönüşümlerini gerçekleştirir ve PIP₃ yoğunluğunun artmasına bağlı olarak PDK1 aktivasyonu gözlemlenir. Daha sonra PDK1 ise Akt'yi fosforilleyerek (p-Akt) aktif hale getirir (94). p-Akt ise mTOR'u fosforilleyerek aktivasyonunu sağlar ve alt yollar üzerinden protein sentezini gerçekleştirir. mTOR, mTORC1 (raptor proteini içerir) ve mTORC2 (riktor proteini içerir) olmak üzere iki farklı bileşene sahiptir.

mTORC1 bileşenindeki raptor, rapamisin tarafından inhibe edilebilirken, mTORC2 bileşenindeki riktör rapamisinden bağımsız olarak protein sentezini sürdürebilme kabiliyetindedir. mTORC1, p-Akt tarafından aktive edilirken, riktör bağımlı mTORC2, serin 473 ve threonine 308 üzerinden Akt'yi fosforile edebilir ve Akt bir kinaz olarak etkinleştirilebilir. Burada dikkat edilmesi gereken bir husus; kanser hücrelerinin büyümesini istemeyiz o yüzden rapamisin kullanarak mTOR aktivitesini azaltabiliriz, ama mTORC2 üzerinden aktivasyonun devam edip hücre büyümesinin önlenemeyeceğini unutmamak gerekir. Bu yüzden, bu çalışmada kullanılan yöntemlerin mTOR üzerindeki etkileri ve sonraki alt yollarla olan ilişkileri merak konusu oldu. Birçok çalışmada resveratrol'ün sirtuin-1 (SIRT1) aktivasyonu aracılığıyla kanser hücre büyümesini engellediği bilinmektedir (95, 96). mTOR kompleksinde bulunan mTORC1 protein sentezinde önemli bir rol üstlenmektedir, bu yüzden daha ayrıntılı bir şekilde bu sinyalizasyonu inceleyecek olursak; p-Akt aktif hale gelir ve TSC1/TSC2'yi fosforilleyerek inhibe eder. TSC1/TSC2 inhibisyonu ile Rheb (Ras homolog expressed in brain) serbestlenmiş olur, serbest halde kalan Rheb, mTORC1 kompleksini aktif hale getirir ve protein sentezi böylelikle devam eder. Diğer taraftan, AMPK ve p53'ün TSC1/TSC2'yi aktive ettiği ve aktive olan TSC1/TSC2'nin de Rheb'i inhibe ederek mTOR inhibisyonuna sebep olduğu bilinmektedir (97).

Aslında, mTORC1 aktivasyonu temelde arjinin ve lösin aminoasitlerinin varlığıyla tetiklenir. Şöyle ki; arjinin aminoasiti, castor1 (C1) inhibisyonunu, lösin aminoasiti ise sestrin2 (S2) inhibisyonunu gerçekleştirir. İnhibe olan C1 ve S2'den dolayı ortamda aktif olarak Gator2 (G2) bulunur ve aktif G2, Gator1 (G1) inhibisyonunu sağlar. G1 inhibisyonu ile Rag aktif formda bulunur ve ekstraselüler regüle edilen kinaz 1/2 (ERK1/2) aktivasyonu sağlar. ERK1/2 aktivasyonu ise TSC1/TSC2 inhibisyonu gerçekleştirir (98).



Şekil 2.3 Arjinin ve Lösin aminoasitlerinin mTORC1 üzerindeki etkisi.

Ras proteini G protein türünde bir pro-onkogendir ve büyüme faktörü sebebiyle hücre içi sinyal yollarında, hücre dağılımında, bölünmesinde, protein taşınmasında aktif rol almaktadır. Guanozin trifosfata (GTP) bağlanarak aktif hale gelen ras sinyal iletimini çekirdeğe ilettikten sonra GTPaz enzimi vasıtasıyla Guanozin difosfata (GDP) hidrolize olarak inaktif duruma geçer. Yara iyileşmeleri, embriyogenik büyüme gibi mitotik faaliyetlerde ras geni ekspresyonu artmaktadır (99).

2.3.2 p70S6K ve 4E-BP1 Protein Sentezi

Serin/Treonin protein kinaz olan Akt, mTOR'u aktiveleştirdikten sonra, mTOR protein sentezini baskılayan ve negatif düzenleyici rol üstlenen 4E-BP1 (PHAS-1)'i fosforilleyerek inhibe eder, p70S6K (S6K1)'i ise fosforilleyerek aktif hale getirir. Fosforillenen 4E-BP1 inhibesine sebep olduğu protein başlatma faktörü eIF-4E kompleksinden ayrılarak inaktif hale gelir ve serbestlenen eIF-4E protein sentezini gerçekleştirir. Diğer taraftan, fosforillenen S6K1, serin 422 üzerinden eIF4B, eIF2B ve rpS6'yı fosforilleyerek protein sentezini sürdürür (100).

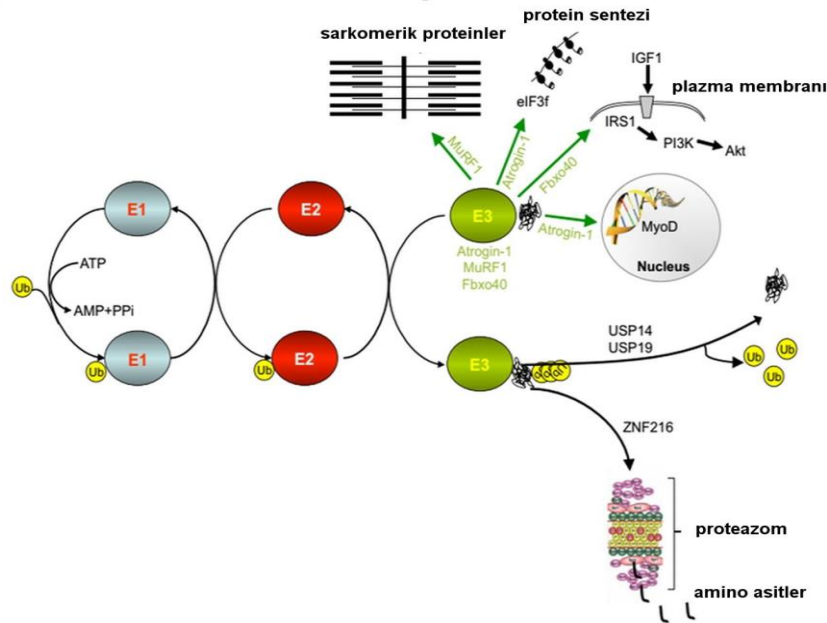
2.3.3 Akt-FOXO-MAFbx-MuRF1 Sinyal Yolağı

Bölüm 2.3.1'de p-Akt tarafından mTOR aktivasyon ve protein sentezinin gerçekleşmesi konu edildi. Bu kısımda ise, p-Akt tarafından GSK 3 β ve FOXO üzerinden gerçekleşen alt sinyal yolları açıklanmaya çalışıldı. p-Akt, serin 9 üzerinden GSK 3 β 'yı inhibe ederek protein sentez baskılanmasının önüne geçmektedir. Bazı çalışmalarda, lityum ile GSK 3 β inhibisyonu yaparak kaslarda önemli derecede hipertrofi oluşumu gözlenmiştir. Eğer, GSK 3 β aktif halde olursa kas gelişiminde etkili olan eIF2B ve NFAT baskılanarak protein degradasyonu gerçekleşmiş olur (101).

Hücre çekirdeğine girerek genetik deformasyonlara yol açabilme kabiliyetinde olan FOXO'lar p-Akt tarafından fosforillenerek inaktif hale getirilir. Aktif halde bulunan FOXO'lar hücre çekirdeğine girerek, kas atrofisinde etkili olan MAFbx ve MuRF1 yukarı regülasyonunu hızlandırır. Ub ligaz elementlerinden olan MAFbx özellikle FOXO3a ve FOXO1 tarafından aktive edilir. MAFbx yukarı regülasyonu ile substratları olan eIF-3F ve MyoD Ub-P yoluyla ubiquitinleştirilerek 26S Proteozom sistemi kanalıyla parçalanır. Benzer şekilde MuRF1 yukarı regülasyonu ile de substratları olan aktin, miyozin, miyozin bağlanma proteini C, troponin I, MyHC, MyLC1 ve MyLC2 gibi sarkomerik proteinler ubiquitinleştirilerek parçalanır ve kaslarda atrofi görülür (1, 102).

2.3.4 Ubikitin Proteozom Sistemi

Genel olarak E1, E2 ve E3 enzimlerinden oluşan bir sistemdir. E1; ATP bağımlı Ub aktive edici enzim, E2; Ub birleştirici enzim ve E3; Ub ligaz enzim olarak ifade edilir. Ub'nin sonundaki karboksil grubu E1 enzime bağlanarak aktif hale getirilir daha sonra aktive olan Ub, E2 enziminin sistein rezidülerine transfer edilir. En son aşamada E2'den gelen Ub'nin hedef proteindeki lizin rezidülerine transferi gerçekleştirilir. Bu şekilde Ub hedef proteine bağlanarak ubikitinleştirme işlemini tamamlamış olur (3). 2000 kDa ve 50 alt ünitelerden oluşan 26S proteozom sisteminde bulunan ZNF216 reseptörleri Ub proteinlerini tanırlar ve proteozoma iletir (103). Proteozoma iletilen çoklu ubikitinlenmiş substratlar sistem dışına peptitler halinde atılır. Kas atrofisini düzenleyen hücre sinyal yolları üzerindeki geçmiş araştırmalar, kalpainlerin kas atrofisinde görülen proteoliz disregülasyonunda anahtar rol oynadığını göstermektedir. Araştırmacılar, kalpain-3'ün hasar görmüş proteinleri daha kısa segmentlere ayırarak sarkomerden atılmalarını kolaylaştırdığını öne sürüyor (12). Böylece E3 ubikitin ligaz, bölünmüş peptit üzerindeki bir ubikitin parçasını kovalent olarak bağlar ve sarkomerik parçaları modifiye edebilir.



Şekil 2.4 Ubikitin Proteozom Sistemi.
Bonaldo ve arkadaşlarından modifiye edildi (104).

2.3.5 Myostatin-Smad2/3 Sinyal Yolağı

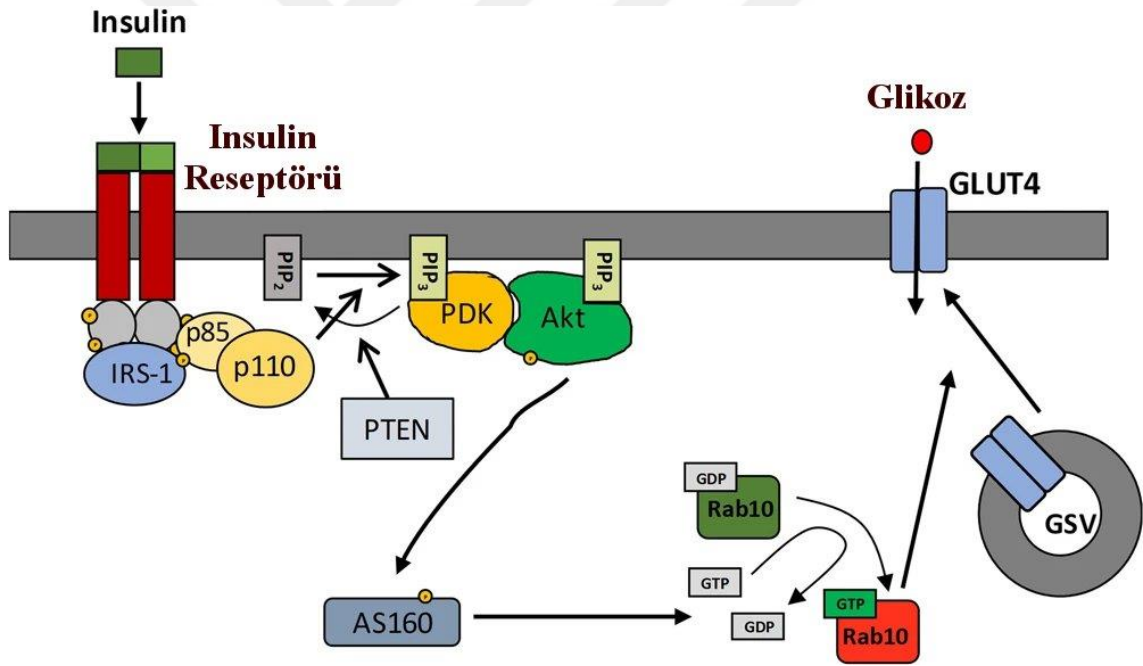
Kas hipertrofisinde negatif düzenleyici olarak rol alan myostatin (MSTN), TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. Bazı çalışmalarda, myostatin -/- farelerin kas kütlelerinde artış olduğu tespit edilmiştir (11). Normal şartlarda, myostatinin sürekli inaktif kalmasına sebep olan MSTN genindeki doğal mutasyonlardır. Aksi durumda, myostatinin fazla ekspresyonu iskelet kas atrofisi şiddetini artırır (105). Follistatin uygulanan çalışmalarda, myostatinin inhibe olduğu ve kaslarda hipertrofi olduğu gözlenmiştir (106, 107). Aktive olan myostatin, iskelet kas kütlelerinde artış sağlayan Tip II aktivine (IIB) bağlanarak bloke eder. Bu durum, smad2/3'ün fosforillenmesine ve aktive olmasına yol açar, aktive olan smad2/3 ise Akt inhibisyonuna sebep olur. Aynı zamanda fosforile smad2/3 ortamda arttığı zaman protein sentezine katkıda bulunan MyoD'yi de inhibe eder (10). Başka bir açıdan bakacak olursak, siRNA ya da rapamisin kullanarak raptor inhibisyonu gerçekleştirilirse ya da Akt'nin mTOR'u aktivasyonu yetersiz kalırsa, myostatin serbestlenerek protein degradasyonuna devam edecektir. Normal koşullardaki gibi mTOR aktif halde olabilseydi, smad2/3 baskılanır ve protein degradasyonu önlenirdi (10).

2.3.6 TNF-alfa Katabolik Yolağı

Pro-inflamatuvar sitokin olan TNF- α , artmış Ub ekspresyonundan ve ubikitinlenmiş protein yığılmalarından sorumludur. Membran üzerindeki TNFR reseptörlerine bağlanarak TRADD-TRAFs-RIP kompleksinde moleküler değişimler yaparak aktivasyon gösterir. Aktive olan RIP, enzimatik reaksiyonlarla IKK (I κ B kinaz)'yi aktive eder (108, 109). Daha sonra aktive olan IKK ise NF- κ B'nin inhibitörü olan ve MuRF1 aşağı regülasyonunu sağlayan I κ B α 'yı fosforiller. Fosforile olan I κ B α , Ub-P yoluyla 26S proteozom sisteminde degrade olurken, serbestlenen NF- κ B rahatça hücre içerisine girerek özellikli DNA sekanslarına (kappa b elementleri) bağlanır ve kas atrofisini hızlandıran MuRF1 aktivasyonunu sağlar, aynı zamanda kas gelişiminde etkili bir protein olan MyoD'nin baskılanmasına da sebep olur (8).

2.3.7 GLUT-4 Aktivasyonu

İskelet kas hücrelerinde enerji kaynağı olarak glikozun içeri alımının GLUT-4 kanal aktivasyonu ile sağlandığı bilinmektedir. Bu yüzden bir yandan atrofik mekanizma araştırılmaya çalışılırken diğer yandan döngünün devam etmesini sağlayacak olan Glut4 proteinlerinin derişim analizleri de bu çalışmanın bir konusu olmuştur. p-Akt'nin Glut4 vezikül translokasyonunu inhibe etme kabiliyetinde olan AS160'ı fosforilleyerek baskıladığı bilinmektedir (110). AS160 inhibisyonuyla, GLUT-4 vezikülleri rahatça hücre membranında GLUT-4 kapılarının oluşması için translokasyona uğrar. Böylelikle glikozun bu kapılardan içeri alımı kolaylaşır, başka herhangi bir bozunma olmaması halinde glikolitik ve oksidatif ATP üretim mekanizmaları işleyişlerine devam eder (111).

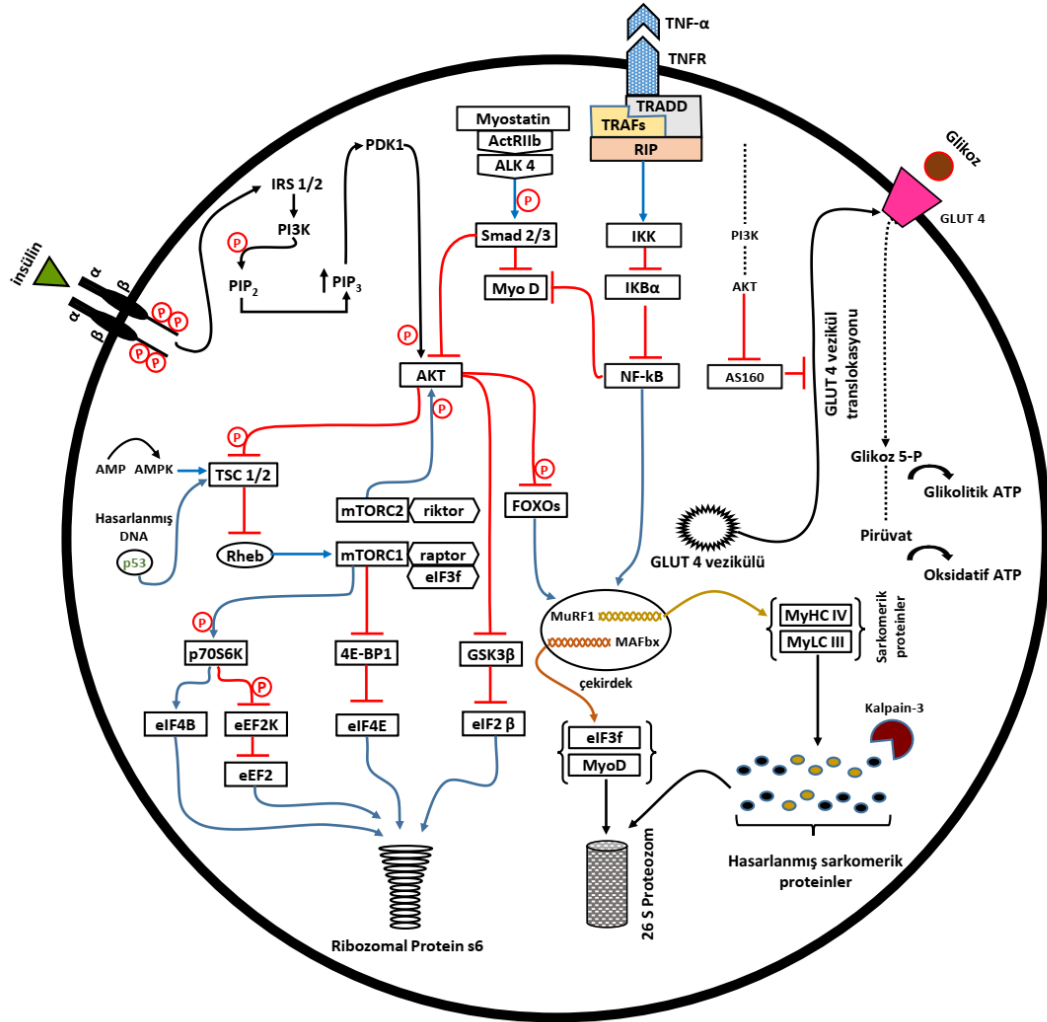


Şekil 2.5 GLUT-4 translokasyonunun şematik gösterimi.

GSV; GLUT-4 saklama vezikülü. Ruth ve arkadaşlarından modifiye edildi (112).

Bölüm 2.3’de atrofik süreçte etkili olan sinyal yolları anlatıldı. Uzun süren araştırma ve makale taramaları sonucunda, tüm süreci bütün hatlarıyla anlamak, protein ve genlerin birbirleriyle etkileşimlerini ortaya koymak, uygulanacak olan yöntemlerinin hangi sinyal yolları üzerinde etkili olduklarını belirlemek ve literatüre atrofi çalışmaları konusunda kapsamlı bir eser bırakmak için kendi izleyeceğimiz sinyal yolları ve kilit rol üstlenen protein ve genleri belirledik (Şekil 2.6).

Çalışmada; insülin, p-AKT, mTOR, FOXO3a, Myostatin, MyHC IIb, GLUT-4, TNF- α ve CAPN-3 protein analizleri ile 4E-BP1, MuRF-1 (Trim63), MAFbx (FBXO32) ve FOXO3a gen ekspresyon analizleri yapıldı.



Şekil 2.6 Çalışmada izlenen sinyal yollarının şematik gösterimi.

2.4 Tip-1 Diyabet ve Protein Metabolizması

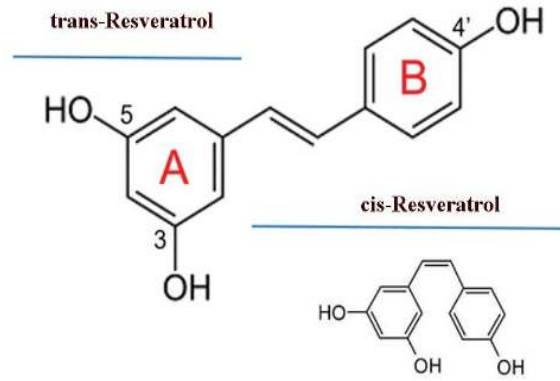
Kas atrofisinin tetikleyicisi olan Ub-P yolağı ve otofaji aktivitelerinde belirli bir artmanın olduğu birçok Tip-1 DM hayvan çalışmalarında ifade edilmiştir (113). İskelet kaslarında meydana gelen atrofik süreçte hücre metabolizmasında faaliyet gösteren proteinlerin birçoğunda fonksiyonel değişimlerin olduğu bilinmektedir (114). STZ indüklenmiş diyabetik sıçanlarda kan glikoz seviyelerinin ve kas kütle kayıp hızının arttığı görülmektedir (115). İnsülin tedavisi almayan Tip-1 DM bireylerde de benzer etkilerin grldėđ ve insülinin protein degradasyonunu önleyici yönde etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (86). İnsülinin insanlarda protein sentezini sağlamak yerine sadece yıkılmasında koruyucu etki sağladığı bilinmekle birlikte, hayvan çalışmalarında ve in vitro çalışmalarda protein sentez aktivasyonunu da sağladığı ifade edilmiştir (116). İnsülinin katabolik yolaklar üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalarda, Ub-P sisteminde bulunan genleri baskılayarak, Ub-P inhibisyonunu sağladığı belirtilmiştir (117). İlk başlarda, insülin eksikliğinin protein yıkımında etkili olan asıl sebep olduğu düşünülse de daha sonraları atrofik koşulların diğer sinyal yolakları üzerinden devam ettirildiği gösterilmiştir (118). Bu sebeple bu çalışmada, insülin tedavisinden bağımsız olarak, potansiyel terapötik özellikler gösteren antioksidan ve non-invazif PMA uygulamalarının sadece protein yıkımının önlenmesinde değil, kas gelişimi ve hipertrofisinde etkili olan sinyal yolakları üzerindeki etkileri de araştırma konusu olmuştur.

2.5 Antioksidanlar

2.5.1 Resveratrol (RSV)

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) zellikle siyah zm kabuğunda ve çekirdeğinde, kırmızı şarapta, dutta, yer fıstığında, birçok meyve ve sebzede bulunan fenoleik bir üründür [14]. zm kabuklarında yaklaşık olarak 50–100 g/g, kırmızı şarapta ise litrede 5 mg resveratrol bulunmaktadır. Tarihte, resveratrol'n (3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene) ilk olarak beyaz hellebore (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) köklerinden elde edildiği tahmin edilmektedir (1940). Terapötik bitkileri hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanan in ve Japonya, köklerinde RSV bulunduran Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*) bitkisini 1963 yılında kullanmaya başlamıştır (119).

Langcake ve Pryce 1976 senesinde yaptıkları araştırmalar doğrultusunda, asma yaprağından elde ettikleri trans-resveratrol'ün mantar enfeksiyonları, soğuk algınlığı ve patojenik mikroorganizmaların iyileştirilmesi konusunda etkili olduğunu ifade etmişlerdir (120, 121). 1992 yıllarında “Fransız Paradoksu” olarak gündeme gelen RSV, Fransız halkının sıkça tükettiği kırmızı şarap içeriğinde tespit edilmiş ve ilgi çekmiştir. Bu paradoksa göre Fransa'nın güney bölgesindeki (özellikle Bordeaux) insanların yağ oranı yüksek gıdalarla beslenmelerine rağmen kırmızı şarap tüketimine, dolayısıyla RSV alımına bağlı olarak kardiyovasküler rahatsızlıklar oranının yok denecek kadar düşük olması dikkat çekici olmuştur (122). RSV'nin karsinogenik koruyucu etkilerinin gözlenmesiyle moleküler düzeyde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Kanser indüklenmiş fareler ile yapılan bir çalışmada, RSV 'nin sirtuin aktivitesine bağlı olarak kanser hücre büyümesini engellediği iddia edilmiştir (95, 96).



şekil 2.7 3,4',5-Trihydroxy-trans-Resveratrol ve cis-Resveratrol moleküler yapısı. Moleküler ağırlığı: 228,24. Chan ve arkadaşlarından modifiye edildi (123)

2.5.1.1 Resveratrol'ün Biyosentezi

Yapısal olarak sentezlenemeyen RSV, ancak dışarıdan olumsuz uyarılara maruz kaldığı zaman (stres, travmatik, UV), 4-kumarol koenzim A (4-kumarol-CoA) ve malonil koenzim A (malonil CoA) tarafından sentezlenir. Aslında RSV sentezi, resveratrol sentaz enzimi aracılığıyla katalizlenir. 1 molekül 4-kumarol-CoA ve 3 molekül malonil CoA birleşimi ile ortaya çıkan tetraket yapının herhangi bir flavonoid (kalkon sentaz) veya RSV (resveratrol sentaz) olması durumu katalizi gerçekleştiren enzimin türüne bağlıdır (124).

2.5.1.2 Resveratrol'ün Emilimi ve Dokulara Taşınması

Yapılan çalışmalara göre farklı dozlarda uygulanan trans-RSV'nin ağızdan alındığı zaman, yaklaşık % 50'sinin 10-15 dakika içerisinde, çoğu ince bağırsağın üst yarısında bir kısmının da alt yarısında olmak üzere emiliminin gerçekleştiği bildirilmiştir. Emilimi gerçekleştikten sonra bazolateral kısma yerleşen RSV, karaciğer ve bağırsakta glükuronit ve sülfat şeklinde bağlanarak metabolize olur. Perfüze olan RSV'nin ve ona eşlik eden bileşenlerinin yalnızca % 6'sı bağırsak epitelinden geçer (125). Konjuge halde bulunan RSV'nin vücut içerisinde dağılımı ve kana karışımı daha kolaydır. RSV'nin yıkımı sonucu oluşan ürünler, karaciğer ve safra kesesi tarafından kandan süzülerek safra ve bağırsaklara alınır, daha sonra bu ürünlerin metabolik emilimi gerçekleşir. Ağızdan alınan RSV'nin kolona geçişi kısa bir zaman olmasına rağmen dokulara taşınımı birkaç saat sürmektedir. 30-60 dakika gibi bir zaman içerisinde kana karışarak karaciğer, böbrek, kalp ve beyin gibi organlara nüfuz etmeye başlar. Trans-RSV 'nin metabolizmada kalma süresi ise yaklaşık olarak 33-38 dakika olarak ifade edilmiştir. RSV'nin karaciğerde gluküronatlanması, duodenumda ise sülfatlanması metabolik etkisini sınırlandırır (126, 127).

2.5.1.3 Resveratrol'ün Biyolojik Etkileri

Nöroprotektif Etki

Yapılan bilimsel çalışmalarda RSV'nin sahip olduğu antioksidan savunma özelliğinin, parkinson, alzheimer, huntington ve epilepsi gibi rahatsızlıklarda sinyal yolları üzerinden özellikle SIRT1 aktivasyonu ile koruyucu etkileri gözlenmiştir (128). RSV sinir doku yapısının korunmasına yardımcı olur, spinal kord hasarlanması sonrası artan proapoptotik Bax artışını durdurur ve anti-apoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunu hızlandırır (129).

DNA–protektif Etki

Resveratrol, DNA hasarını iki farklı yolla engeller. Birinci yol, siklooksijenaz (COX) ve sitokrom P450'yi inhibe ederek karsinojen bileşikler metabolik olarak detoksifiye yapabilen kinin redüktaz gibi FAZ-2 enzimlerinin indüksiyonu yoluyla antimutagen olarak etki etmesi. İkinci yol, reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından oluşturulan DNA hasarı boyunca bir antioksidan olarak etki etmesidir (130).

Resveratrol'un meme kanseri başlangıcı üzerindeki kimyasal önleyici etkisi MCF-10F hücrelerinde araştırılmıştır. RSV'nin östrojen genotoksiste yolunda birden fazla bölümü bloke ederek, DNA hasarını inhibe ettiği ve meme kanseri başlamasını önleyebileceği ifade edilmiştir (131).

Antioksidan Etki

Üç farklı antioksidan mekanizması tanımlanmıştır: (i) koenzim Q ile rekabet ve oksidatif zincir kompleksini azaltmak için ROT üretimi alanı, (ii) mitokondride oluşan radikalleri temizlemek ve (iii) Fenton reaksiyon ürünleri ile indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe etmek (130). İn vitro koşullara nazaran RSV'nin canlı organizmalar üzerinde antioksidan etkisi daha güçlüdür (132). Kadmiyum klorürün sıçan testislerinde sebep olduğu lipid peroksidasyon etkisi RSV ile azaltılmış ve aynı zamanda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi artırılmıştır (133).

Anti-inflamatuvar Etki

İnflamasyon, artrit, crohn hastalığı ve sedef hastalığının patolojisinin merkezinde yer alır ve hem kardiyovasküler hastalık hem de kanser gelişiminde rol oynayabilir. Siklooksijenaz enzimleri, hem siklooksijenaz hem de 5-lipoksijenaz yolları tarafından pro-inflamatuvar moleküllerin üretiminde rol alan çok önemli enzimlerdir ve siklooksijenaz inhibitörleri yaygın olarak anti-inflamatuvar ilaçlar olarak kullanılırlar. Resveratrol, in vivo koşullarda siklooksijenaz aktivitesinde etkili bir inhibitör olduğundan, antiinflamatuvar özellikler taşımaktadır. RSV hem akut hem de kronik kimyasal yolla oluşturulan ödem lipopolisakkarid ve osteoartriti önemli ölçüde azaltır ve allogreft (aynı türler arasındaki doku transferi) reddinin korunmasına yardımcı olur (122). Başka bir çalışmada RSV, nükleer faktör kappa B'nin (NF-κB) inhibisyonunu yaparak antiinflamatuvar etki göstermiştir (134).

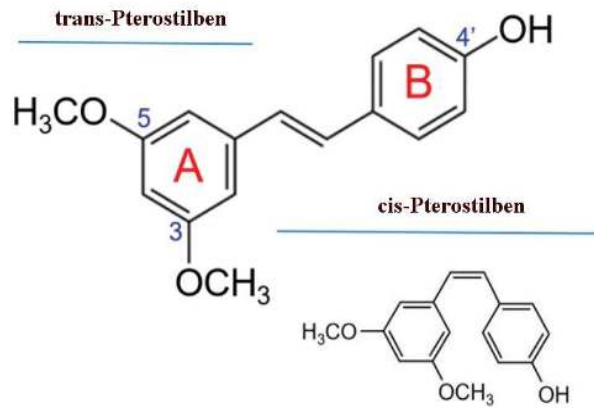
Anti-kanser Etkisi

Kronik inflamasyonun çeşitli kanserlere yol açabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, inflamasyonun önlenmesi aynı zamanda kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi için umut verici bir yaklaşımdır. RSV, azalmış prostagladin E2 seviyesinde (IC₅₀= 32,2 µM) oluşan siklooksijenaz -1 (COX-1) ve COX-2 aktivitesini inhibe eder.

Aktive olmuş makrofajlarda indüklenabilir nitrik oksit sentaz'ı (iNOS) ve toll benzeri reseptör 3 (TLR3) ve TLR4 inflamatuvar yolaktaki adaptör-indükleyici interferon- β içeren TIR domaini (TRIF) sinyalinde, TANK bağlı kinaz 1 (TBK1) aktivitesini baskılar (135). RSV, doku plazminojen aktivatörü (TPA) indüklenmiş fare derisinde I κ B kinaz (IKK) aktivitesini inhibe ederek, COX-2 ekspresyonunu ve NF- κ B aktivasyonunu önemli ölçüde inhibe eder

2.5.2 Pterostilben (PTS)

Pterostilben (3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) ilk olarak 1940'ta Hindistan ve Hint adalarına özgü olan Pterocarpus santalinus'un (kırmızı sandalağacı) öz odundan izole edilmiştir. Sonraları, yaban mersini (9,9-15,1 mg/kg taze ağırlık), chardonnay üzümü (UV ile indüklenmemiş meyvelerinde 4,7 mg/g'a kadar taze kabuk ağırlığı), pterocarpus marsupium (Indian Kino) ve guibourtia tessmanii bitkisinden de PTS elde edilmiştir (136). Pterostilben ve resveratrol'ün birçok farmakolojik özelliklerde benzer etkiler gösterdiği bilinmektedir. RSV'ye kıyasla PTS'de daha güçlü farmakolojik özelliklerin bulunması PTS'nin sahip olduğu iki-OCH₃ grubuna bağlanmıştır (136). PTS bu sayede, zar geçirgenliğini, biyoyararlanımını ve biyolojik gücünü arttıran daha lipofilik bir yapıdadır. Biyoyararlanımı gelişmiş olan PTS'nin kanser, iltihaplanma, dislipidemi, bilişsel bozukluklar, kardiyovasküler ve metabolik bozuklukların hafifletilmesinde çeşitli faydalara sahip olduğu bilinmektedir. Farmakolojide, biyoyararlanım ilaçların temel farmakokinetik özelliklerinden birisidir ve uygulanan ilaç miktarının sistemik dolaşıma geçen oranını belirtmek üzere kullanılır (137).



Şekil 2.8 3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene trans-Pterostilben ve cis-Pterostilben. Chan ve arkadaşlarından modifiye edildi (123).

2.5.2.1 Pterostilben'in Terapötik Etkileri

Genel olarak, pterostilben, membran geçirgenliği ve metabolik kararlılık açısından resveratrol'den daha iyi performans gösterir. Çalışmalar, hem resveratrol hem de pterostilbenin insanlarda kullanımının güvenli olduğunu göstermiştir. 40 sağlıklı gönüllü üzerinde yürütülen bir klinik araştırmada, resveratrol'ün, bazı gastrointestinal rahatsızlıklara neden olan 2.5 ve 5.0 g dozları dışında, 29 gün boyunca 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 g günlük dozlarda kullanımının güvenli olduğu bulunmuştur (138). Başka bir çalışmada, Resvida™'nin (yüksek saflıkta resveratrol) 28 günlük 50, 150 ve 500 mg/kg vücut ağırlığı dozunun ve 90 günlük 700 mg/kg vücut ağırlığı dozunun, sıçanlar üzerinde herhangi bir yan etki göstermediği bildirilmiştir (139). Pterostilben için, 80 sağlıklı gönüllüde 6-8 hafta boyunca yürütülen bir klinik çalışmada (randomize, çift kör ve plasebo kontrollü), pterostilbenin genellikle 250mg/gün'e kadar olan dozlarda tüketim için güvenli olduğu gösterilmiştir (140). Biyokimyasal analizler, pterostilbenin karaciğer, böbrek ve glukoz belirteçleri üzerinde hiçbir yan etkisinin olmadığını göstermiştir (137). Araştırmacılar, sıçanlarda resveratrol'den daha fazla pterostilben oral emilim ve hücre alımının olduğunu bildirmişlerdir (123). PTS'nin çeşitli hastalık süreçlerinin başlatılması ve patogenezinde rol oynadığı düşünülen, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonu (O_2^-) gibi oksidatif stres (OS) ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini azalttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, pterostilben ile iyileştirilen çeşitli hücre soylarında, antioksidant katalaz, toplam glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GRx) ve süperoksit dismutaz (SOD) ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (141).

Antikanser Etkisi

Birçok çalışma yaban mersini ekstraktının ve pterostilbenin meme kanserini in vitro ve in vivo koşullarda inhibe ettiğini göstermiştir. Göğüs kanseri hücrelerinin tedavisinde kullanılan PTS, hücre ölümünde önemli bir rol oynayabilen hücre oksidatif aktiviteyi iyileştirmektedir. Alosi ve arkadaşları, pterostilbenin apoptozu indüklediğini, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini bulmuşlardır (142).

Birçok çalışmada, pterostilbenin in vitro ve in vivo koşullarda pankreatik kanseri, mitokondriyal olarak türetilmiş apoptoz mekanizmaları, transkripsiyon faktörlerinin modifikasyonu ve proliferasyonun inhibisyonu yoluyla inhibe ettiği gösterilmiştir (143, 144).

Antioksidan Etkisi

Yaban mersini takviyesi çalışmalarında, pterostilbenin antioksidan aktivitesinin kardiyoprotektif olarak önemli etkileri gözlenmiştir. Pterostilben, vasküler düz kas hücreleri (VSMC) ve vasküler endotel hücrelerinin düzenlenmesi yoluyla ateroskleroza karşı çok sayıda koruyucu yarar sağlamıştır. Deneysel çalışmalarda, pterostilben ile iyileştirilen vasküler düz kas hücreleri, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ile indüklenen proliferasyonda ve bir serin-treonin kinazı olan Akt'ta azalma sergilemiştir (145).

2.5.2.2 Pterostilben'in Farmakokinetiği

PTS ve RSV bazı farmakolojik özellikler bakımından kıyaslandığında; PTS'nin daha uzun yarılanma ömrüne (PTS; 105 dakika ve RSV; 14 dakika) ve daha yüksek biyoyararlanıma (PTS; % 80 ve RSV; % 20) sahip olduğu görülmektedir. Pterostilben ayrıca düşük toplam vücut klirensine ve ardından geniş doku dağılımına işaret eden yüksek V_{ss} 'ye (görünen dağılım hacmi) sahiptir (137). Pterostilben moleküler ağırlığı 256.296 g/mol, fenilpropanoid yolaktan türetilen stilben bileşiğin doğal bir türevidir (146). Bir başka, antikanser aktivite, antioksidan kapasite, antiinflamatuvar aktivite ve diğer sağlık için yararlı potansiyel faydalara sahip, stilben grubundan olan resveratrol'ün yapısal analogudur (147). PTS farmasötik ve beslenme gıdalarının uygulamalarında büyük bir potansiyel değere sahiptir, ancak pterostilbenin zayıf su çözünürlüğü ve kararlı yapısı onun uygulanılabilirliğini ve in-vivo biyolojik kullanılabilirliklerini ciddi ölçüde sınırlamaktadır. Özellikle pterostilben ışık ve hava ile kararsızdır çünkü fenolik hidroksil kolayca oksitlenebilir ve trans konfigürasyonu önemli bir aktivite göstermeyen cis konfigürasyonuna dönüşebilir. Bu nedenle uygun biyolojik etkiyi elde edebilmek, pterostilbenin çözünürlük ve stabilitesini arttırmak için uygun bir dağıtım sistemi bulmak önemlidir (148).

2.5.3 Manyetik Alan Tarihçesi ve Adey Penceresi

Ekvatorda 0,33 gauss ve kutuplarda yaklaşık 0,66 gauss (1 Tesla = 10.000 gauss veya 1 gauss = 0.0001 Tesla) olmak üzere dünyanın manyetik alan yoğunluğunun nispeten zayıf olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar dünyanın manyetik alanının son 300 yılda % 50 oranında azaldığı ve daha da kötüye gittiğini bildirmektedir.

1951'de henüz tanınmayan bir bilim adamı, dünyanın frekanslarıyla olan derin bağlantımızı anlama şeklimizi değiştiren bir keşif yaptı. Münih Teknik Üniversitesi'nden Winifred Otto Schumann atmosferde, dünya yüzeyinin ve iyonosferin oluşturduğu boşlukta duran elektromanyetik dalgaların olduğunu öngördü. Bu keşif, Dr. Schumann'ın elektriğin fiziğini anlatırken öğrencilerine sorduğu bir soruyla gerçekleşti. Küresel kondansatörler (kapasitörler) ile ilgili bir ders sırasında öğrencilerinden iç ve dış küre arasındaki frekansı hesaplamalarını istedi ve örnek olarak dünya ve iyonosfer tabakasını verdi. Yaptığı hesaplamalar sonucunda cevabın 10 Hz frekansa denk gelmesi, yani dünyayı ve üzerindeki tüm yaşamı çevreleyen ölçülebilir bir frekansa sahip olması Schumann'a inanılmaz göründü. Dr. Schumann'ın keşfi küçük bir Alman bilim dergisi olan Technische Physik'te yayınlandı ve arka sayfalarda "Schumann-Rezonansı" başlığı altında yer aldı (149, 150).

1924'te Hans Berger, kendi yaptığı bir EEG (elektroensefalogram) makinesini kullanarak, insan beyni tarafından iletilen elektrik frekansının ilk kaydını ölçebildi. "Berger dalgası" olarak da bilinen alfa dalgası ritmini (7,8 Hz – 13 Hz) tanımlayabildi (151). Max Planck Enstitüsü'nden ünlü bilim adamı Dr. Rutger Wever, insanlardaki sirkadiyen ritimleri incelemek için 1960'ların başında dünyanın doğal rezonanslarından (Schumann rezonansı) tamamen korunmuş yer altı sığınakları inşa etti. 30 yılı aşkın bir süre boyunca, sığınaklarda bir seferde birkaç hafta geçiren sadece genç ve sağlıklı gönüllü öğrencilerin katıldığı deneyler yaptı. Dr. Wever, çalışmalarında; Schumann rezonansı'nın sığınaktan filtrelendiği zaman, öğrencilerde zihinsel ve fiziksel sağlık sorunlarının ortaya çıktığına dikkat çekti. Schumann rezonansı olmayan sığınaktaki öğrenciler, kısa bir süre sonra hasta hissetmeye, baş ağrısı, duygusal sorunlar, stres ve depresyon yaşamaya başladı. Temelde sirkadiyen ritimlerinin bozulduğu gözlemlendi.

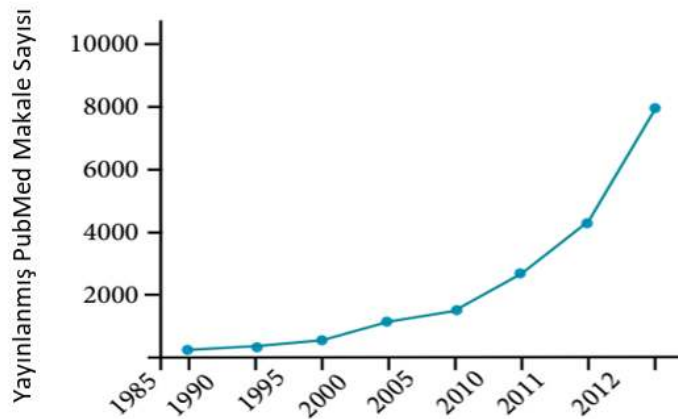
Dr. Wever tam olarak 7,83 hertzlik bir pulslu manyetik alan üretici kullanarak uyguladığı tedaviyle ortaya çıkan sorunları hafifletebilmişti. Wever, bu frekansın dünyanın mikropülsiyonları içinde de vücuttaki biyoritimler için ana zamanlayıcı olduğu sonucuna vardı (152). Dr. Wever'in sonuçları insan sağlığı ile gezegenin frekansı arasında inanılmaz bir bağlantı olduğunu gösterdi.

Dr. Schumann'ın hesapladığı dünyanın sahip olduğu 10 Hz frekansı ve Dr. Wever'in çalışmaları, bize insan ve doğa arasında bir manyetik alan uyumu olduğu hissini uyandırmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalar daha teknik ve bilimsel olgulara dayandırılarak pulslu manyetik alan uygulamalarının tedavideki değerini göstermektedir (153).

Manyetik alanın pozitif etkisinin yoğun olarak görüldüğü aralığa "Adey penceresi" adı verilmektedir. Adey penceresi genellikle genlik, frekans ve bunların doğru kombinasyonları ile tanımlanmaktadır. Çalışmalarda, en az üç genlik penceresinin bulunduğu gösterilmiştir: 50–100 μ T (5–10 Gauss), 15–20 mT (150–200 Gauss) ve 45–50 mT (450–500 Gauss) (154). Terapötik pencerelerin varlığı yeni bir kavram değildir ve manyetik alan terapisiyle sınırlı değildir (155). Temelde enerjinin iletilmesi için, en uygun pencere aralığını bulmak üzerine kurulu olan bu sistemde; alan kuvveti (genlik, yoğunluk), puls (frekans) ve uygulamanın süresi gibi parametreler bu aralığı bulmada yardımcı olur. En uygun biyo ve klinik etkiler, bahsedilen bu parametrelerin en doğru ölçeklerde seçilmesiyle gerçekleşebilir. Hastalık türlerine göre doku ve organlara uygulanan manyetik alan uygulamalarının uygun adey penceresi aralığında değişim gösterdiği halen daha araştırma konusudur. Bu yüzden optimal konumdan ne kadar uzaklaşırsa, müdahale de o kadar az etkili olmaktadır (153). Biz de önceki çalışmalardan yola çıkarak, termal olmayan düşük frekanslı pulslu manyetik alan uygulamalarının diyabetik iskelet kas atrofisinde belirleyeceğimiz protein, gen ve morfoloji üzerindeki etkilerini ayrıntılı araştırmak istedik.

2.5.3.1 Pulsu Manyetik Alan Uygulamaları

Manyetik ve elektromanyetik alanlar artık 21. yüzyıl tıbbi tarafından, geleneksel tıp başarısız olduğunda bile çeşitli sağlık sorunlarının iyileşmesini vaat eden gerçek fiziksel varlıklar olarak kabul edilmektedir. Günümüzde manyetoterapi, yaralanma bölgesini, ağrı ve inflamasyonun kaynağını ve diğer hastalık ve patolojileri doğrudan tedavi etmek için invazif olmayan, güvenli ve kolay bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (156). Tıp camiası manyetoterapi kullanımına, özellikle çeşitli kas-iskelet yaralanmalarının tedavisinde yardımcı bir tedavi yöntemi olarak yaklaşmaktadır. Zamanla değişen manyetik alanların fizyolojik ve klinik olarak anlamlı bir şekilde moleküler, hücresel ve doku işlevlerini iyileştirebildiğine dair çok sayıda temel bilim ve klinik kanıtlar vardır (153, 157, 158). Birçok çalışmada, PEMF'nin kemik birleşmesine yardımcı olduğu; ağrıyı, ödemi ve iltihabı azalttığı; kan dolaşımını artırarak bağışıklık ve endokrin sistemleri uyardığı bildirilmektedir. Biyoelektromanyetik topluluğu tarafından, biyolojik sistemlerle zayıf elektrik ve manyetik alanların etkileşimlerinin biyofiziksel mekanizması ve biyolojik transdüktif mekanizması kuvvetli bir şekilde çalışılmıştır. Termal olmayan EMF'nin iyon bağlanması ve/veya taşınmasını doğrudan etkileyebileceği ve muhtemelen doku büyümesi ve onarımı ile ilgili biyolojik süreçlerin kademesini değiştirebileceği varsayılmıştır. Manyetik alan uygulamaları son yıllarda gittikçe artan bir ilgi görmektedir (Şekil 2.9) (159).



Şekil 2.9 Manyetik Alan Terapisi konusunda, hakemli dergilerde yayınlanmış makalelere olan ilgi (1985-2012).

2.5.3.2 Pulsu Manyetik Alan ve DM

Diyabetik polinöropatili hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, 10-100 Hz karmaşık modülasyonlu pulslu elektromanyetik alan uygulamasının sinir iletkenliği ve refleks yanıtlarında iyileşmeler yaptığı gösterilmiştir (160). Diyabetik periferik nöropatili (DPN) hayvan modellerinde gelişen anormalliklerin, pulslu elektromanyetik alan (PEMA) uygulaması ile önlenilebileceği gösterilmiştir. PEMF'nin hasarlı sinirler üzerinde doğrudan düzeltici etkileri olabileceği ve DPN'nin tedavisi için potansiyel olarak ümit verici non-invaziv bir terapötik araç olacağı öne sürülmektedir. Bununla birlikte, PEMF'nin DPN üzerindeki spesifik mekanizmalarını aydınlatmak ve PEMF'in klinik uygulama için uygulanabilirliğini doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. İnsülin'in protein yıkımında koruyucu rol üstlendiği bilinmektedir, bu sebeple insülin salınımındaki değişiklikleri araştırmak için yapılan bir çalışmada, in-vitro ortamda geliştirilen beta hücreleri üzerine 60Hz-5mT manyetik alan uygulandı ve sekresyonda artış olduğu gözlemlendi (161). Pankreasın işlev ve yapısını incelemek için yapılan bir hayvan çalışmasında, 10 Hz, 1.8-3.8 mT kare dalga ve 40 Hz, 1.3-2.7 mT sinüzoidal manyetik alan uygulamalarının deneyin 14. gününde hayvanlardaki glikoz seviyelerini azalttığı, insülin seviyelerinde artış sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, kare dalga şeklinde uygulanan manyetik alanın sinüzoidale göre daha belirgin ve uzun süreli etki yaptığı da ifade edilmiştir. DC manyetik alanların iyon yüklerinde polarizasyona sebep olduğu, AC manyetik alanların ise iyon yüklerinde titreşim yapabilme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (162) Bu bilgiler doğrultusunda, manyetik alan uygulamalarına bağlı olarak beta hücrelerinde bulunan kalsiyum iyonlarının titreşim frekansı yoluyla tetiklendiği ve insülin salınımının aktif hale getirilebileceği ön görülmektedir (163). Benzer şekilde başka çalışmalarda; çok düşük frekanslı (quasi rectangular) manyetik alan uygulamalarının sodyum iyonları üzerinden aksiyon potansiyelinde değişiklikler yapabileceği öne sürülmüştür (164-166).

PEMF, 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 (167).

2.5.3.3 Pulsu Manyetik Alan ve İskelet Kası Atrofisi

Diyabetik kas atrofisi, normal günlük aktiviteleri etkileyen iskelet kası boyutunda ve gücünde bir azalmaya neden olur. Pulsu elektromanyetik alanların denerve kaslarda tip II liflerin atrofisini geciktirebildiği gösterilmiştir. Bu sebeple, STZ indüklenmiş diyabetik kas atrofisi üzerine yapılan bir çalışmada, 6 hafta boyunca 15 Hz, 1.46 mT, 30 dakika/gün PEMF uygulanmış ve STZ indüklenmiş gruptaki hayvanların kan şekeri seviyesinin düştüğü ve metabolik enzimlerin aktivitesinde iyileşme olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, PEMF uygulamasının azalan kas lifi kesit alanını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. PEMF uygulamasının protein kinaz B (Akt) ve mTOR'u aktive ettiği ve diyabetik gruba kıyasla myostatin, ActRIIB ve FoxO1 aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (168).

Başka bir çalışmada, PEMA'nın diyabetik sıçanlarda fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ekspresyonunu yukarı regüle ve ERK1/2 yolunu aktive ederek akut arka bacak iskemisi ile ilişkili perfüzyonu ve anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle PEMA'nın, iskemik hasarlı diyabetik hastaların tedavisi için değerli olabileceği düşünülmektedir (169)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Aralık 2019-Kasım 2020 tarihleri arasında Ç.Ü Biyofizik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. TÜBİTAK "1002-Hızlı Destek Programı" kapsamında sunmuş olduğumuz 319S095 numaralı ve "Streptozotosin ile İndüklenmiş Yavaş ve Hızlı İskelet Kasları Atrofisinde Pulsu Manyetik Alan ve Antioksidan Tedavisinin Karşılaştırılmalı Etkileri" başlıklı projemiz kabul edilmiş ve desteklenmiştir. Çalışma için gerekli olan Ç.Ü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Belgesi alınmıştır.

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada, ağırlıkları 350-400 g arasında değişen Wistar Albino türü 100 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ÇÜTF DETAUM) temin edildi. Deney süresince hayvanlara intra peritoneal (i.p) antioksidan uygulaması ve non-invazif pulslu manyetik alan uygulaması Ç.Ü Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Deneysel diyabetik hayvan modeli çalışması olduğu için, iş yükünü hafifletmek adına Şubat, Mart ve Nisan aylarında kontrol, diyabet ve diyabet+pulsu manyetik alan grupları çalışıldı. Daha sonraki Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında diyabetik hayvanlara antioksidan ve antioksidan+pulsu manyetik alan uygulaması yapılan gruplar çalışıldı.

Hayvanlar tip 2 kafeslerde (363 cm³) ve her kafeste en fazla 5 hayvan olacak şekilde barındırıldı. Ad-libitum beslenme olarak standart pellet sıçan yemleri ve çeşme suyu kullanıldı. Diyabetik hayvanlarda çok sık idrar ve dışkılama görüldüğünden dolayı, stres faktörü oluşmaması için her gün düzenli olarak kafes altı temizlikleri yapıldı. Hayvanların muhafaza edildiği ortam; 12 saat aydınlık-12 saat karanlık, 22-27 °C sabit sıcaklık ve % 40-60 nem oranına sahip olacak şekilde ayarlandı. Aspiratör yardımıyla ortamda temiz hava değişimi sürekli sağlanmaya çalışıldı.



Şekil 3.1 Hayvanların barındırıldığı oda (sol) ve Kan glikoz ölçümü (sağ)

3.1.1 Deneysel Diyabet Oluşturma

Hayvanlar bulundukları ortama alışmaları için bir hafta müdahale edilmeden beklendi. Daha sonra Streptozotosin (STZ, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) ile indüklenmiş diyabet yapılmadan önce, kan glikoz seviyeleri ve ağırlıkları not edildi. Hayvanların ağırlıklarına göre 0.1 M soğuk sitrat tamponu (pH=4.6) içerisinde 45 mg/kg/mL STZ çözündürülerek hazırlandı. Sıçanlar anestezi vaporizatörü ile % 60 O₂ 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 glikoz seviyeleri ölçüldü. Kan glikoz seviyeleri ≥ 16.7 mMol/L olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Bu seviyenin altında olan sıçanlar ikinci defa STZ uygulanarak diyabet indüklemesi yapıldı.

3.1.2 Deney Grupları

Sıçanlar başarılı bir şekilde STZ ile diyabet indüklendikten sonra, her grupta n=10 hayvan olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Deney süresi 5 hafta olacak şekilde uygulamalar yapıldı.

Kontrol (K); diyabetik olmayan sağlıklı grup, hiçbir müdahale yapılmadı.

Diyabet(DM); STZ uygulanan grup, her gün i.p. olarak 1ml serum fizyolojik (SF) uygulandı.

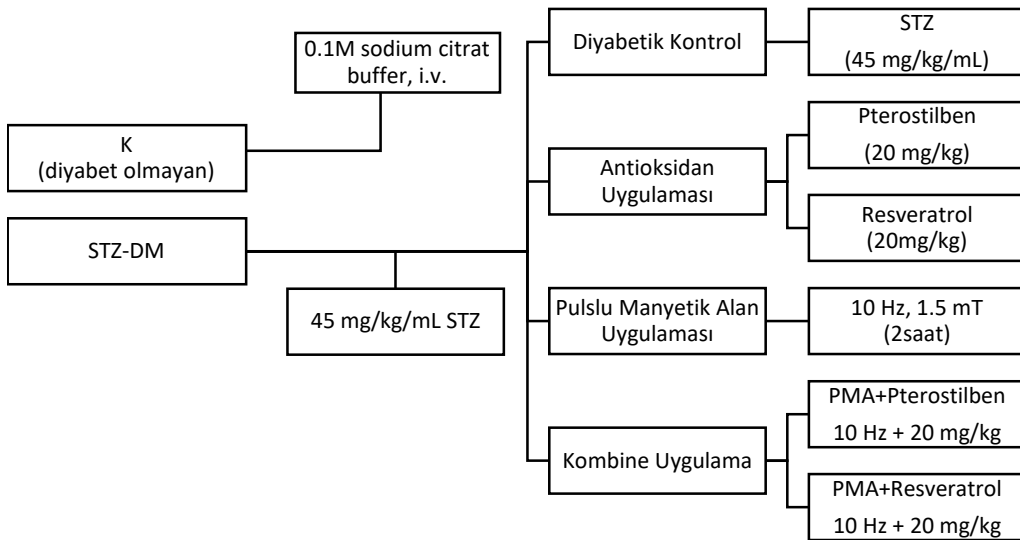
Diyabet+Pterostilben (DM+P); her gün % 30 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülmüş 20 mg/kg vücut ağırlık dozda pterostilben uygulaması yapıldı.

Diyabet+Resveratrol (DM+R); her gün % 30 DMSO içerisinde çözdürülmüş 20 mg/kg vücut ağırlık dozda resveratrol uygulaması yapıldı.

Diyabet+Pulsu Manyetik Alan (DM+PMA); her gün 2 saat boyunca 10 Hz, 1.5 mT şiddetinde pulslu manyetik alan uygulaması yapıldı.

Diyabet+Pulsu Manyetik Alan+Pterostilben (DM+PMA+P); her gün, sıçanlara % 30 DMSO içerisinde çözdürülmüş pterostilben i.p. uygulandıktan sonra 3-5 dakika içerisinde 2 saat boyunca 10 Hz, 1.5 mT şiddetinde pulslu manyetik alan uygulaması yapıldı.

Diyabet+Pulsu Manyetik Alan+Resveratrol (DM+PMA+R); her gün, sıçanlara % 30 DMSO içerisinde çözdürülmüş resveratrol i.p. uygulandıktan sonra 3-5 dakika içerisinde 2 saat boyunca 10 Hz, 1.5 mT şiddetinde pulslu manyetik alan uygulaması yapıldı.



Şekil 3.2 Deney gruplarının şematik gösterimi.

3.2 Kan Glikoz ve Ağırlık Takibi

Deney grubundaki hayvanların her hafta sonu cumartesi günleri kuyruklarından hafif kesi ile kan glikoz seviyeleri takip edildi. Aynı zamanda her hafta sonu pazar günleri ise ağırlık ölçümleri kaydedildi.

3.3 Antioksidanların Hazırlanması ve Uygulanması

Bu çalışmada kullandığımız pterostilben (trans-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) ve resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene) antioksidanları, New Jersey-USA menşei Sabinsa şirketinden (20 Lake Dr, East Windsor, NJ 08520, USA) hibe yoluyla temin edildi. Antioksidanlara ait yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC, >% 99) sonuçları şirket tarafından sağlanmıştır. Antioksidanlar her gün taze olarak hazırlandı ve hayvanlara enjekte edilen toplam hacim 1 mL'yi geçmeyecek şekilde ayarlandı. % 30 DMSO içerisinde çözdürülen PTS ve RSV miktarları sırasıyla ≤ 30 mg/mL ve ≤ 50 mg/mL olarak tayin edildi. Antioksidanların homojen çözünmesi için 5-10 dakika vorteksleme işlemi yapıldı. Kullanılan antioksidanların UV hassasiyetleri sebebiyle ışıktan korunmaları için flakon tüplerin etrafı alüminyum folyo ile sarıldı ve hafif aydınlatılmış karanlık odada hazırlandı. Uygulama yapılırken her seferinde steril insülin enjektörleri kullanıldı.



Resveratrol

Pterostilben

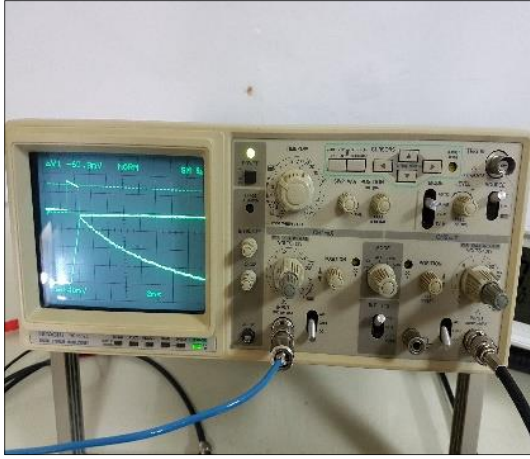


Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan Pterostilben ve Resveratrol Antioksidanları (sol) ve hayvanlara i.p. enjeksiyon uygulaması (sağ).

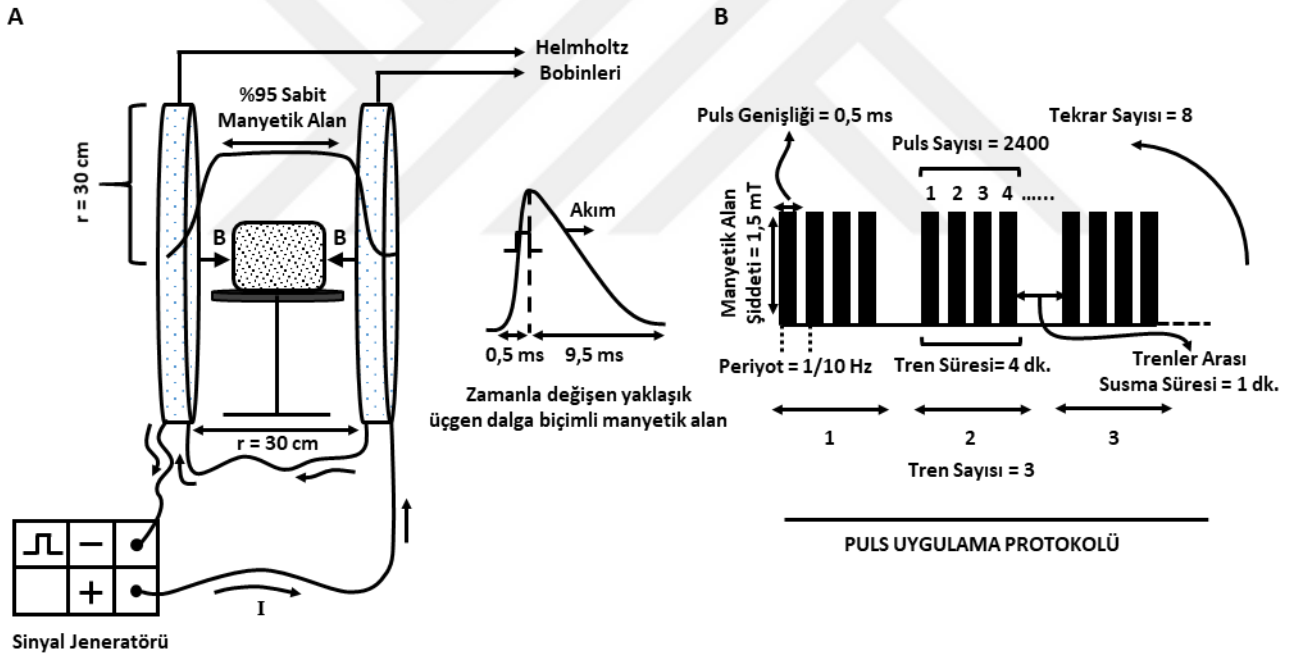
3.4 Pulsu Manyetik Alan Uygulaması

PMA uygulaması, $2r=60$ cm çapında, $r=30$ cm aralığa sahip iki Helmholtz bobini kullanılarak yapıldı. Programlanabilir bir sinyal üreticisine (ILFA Elektronik, Adana, Türkiye) bağlandığında, bu bobinler üzerinden istenilen frekans ve şiddette manyetik alan çıkışı sağlanabilmektedir. Daha önce bölümümüzde gerçekleştirilen birçok çalışmada bu cihazın iyileştirici etkilerinin olduğu gösterildi (18, 170-174). PMA uygulamasıyla ilgili diğer çalışmalara baktığımızda özellikle çok düşük frekanslı manyetik alan uygulamalarının (≤ 300 Hz) iyileştirici etkilerinin olduğunu gösteren çok sayıda makaleye rastlanılmaktadır (157, 168). Biz de bu çalışmada, sıçanlara 5 hafta boyunca günde 2 saat 10 Hz, 1.5 mT şiddetinde PMA uyguladık.

Manyetik alanın pik değeri bölümümüzde bulunan Hall etkili bir prob yardımıyla manyetik alan ölçmeye yarayan Gaussmetre (F.W. Bell Model 6010, Sypris Company, Orlando, FL) ile yapıldı. Öncesinde ön çalışmalarını yaptığımız sistemde, zamanla değişen manyetik alanın, 0.5 ms'lik bir yükselme süresi ve 9.5 ms'lik bir düşme süresi ile yarı-üçgen bir dalga formundan oluştuğu gözlemlendi. İndüklenen elektrik alanının dalga formu, Helmholtz bobinlerinin orta merkez eksenine yerleştirilen bir araştırıcı bobin prob (50 mm iç çaplı, 50 sarımlı, 30 gauge bakır tel) kullanılarak ölçüldü. Prob uçları bir osiloskopa (Hitachi, Tokyo, Japonya) bağlandı ve indüklenen voltaj doğrudan okundu. Karşılık gelen indüklenmiş elektrik alanı, bobinler arasında yer alan tutucuda 0.6V/m (0.59-0.61 V/m) tepe elektrik alanlarına sahip olan tek kutuplu bir dikdörtgen dalga biçiminde olduğu gözlemlendi. Bobinler arasındaki maksimum indüklenen elektrik alanı Faraday yasası kullanılarak hesaplandı. Devredeki akım ($I = 5,2$ A), güç amplifikatörünün ve bobinin çıkışı arasında seri olarak bağlanan bir direnç ($0,1 \Omega$) üzerinden bir osiloskop üzerinde de izlendi. Programlanabilir bir güç kaynağına bağlanan Helmholtz bobinleri, güç kaynağı üzerindeki Puls Level (Puls seviyesi) ayarlanmasıyla istenilen şiddette manyetik alan üretimine imkân tanımaktadır. Kontrolleri yukarıda anlatıldığı şekliyle yapıldı.



Şekil 3.4 Helmholtz bobinleri arasında ölçülen manyetik alanın şekli (sol) ve manyetik alan ölçüm sisteminin genel görünümü (sağ).



Şekil 3.5 Manyetik alan uygulama protokolü ve şematik gösterimi.



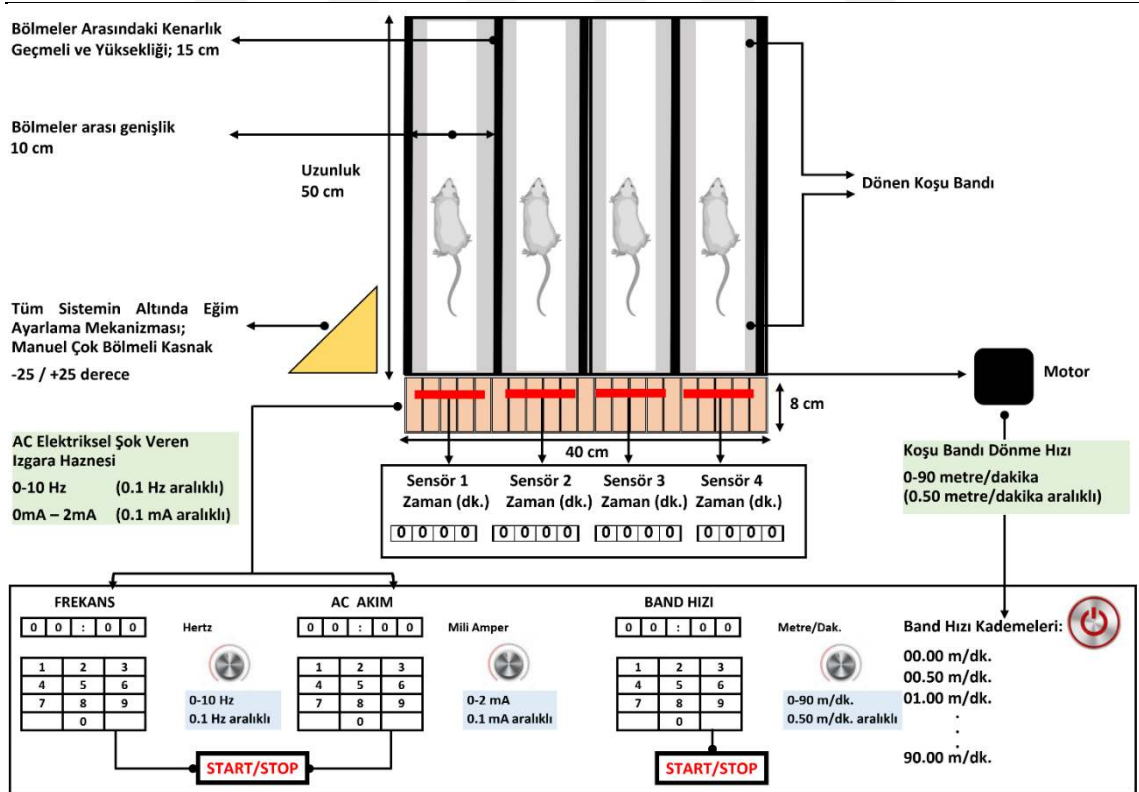
Şekil 3.6 Faraday kafes içerisinde sıçanlara uygulanan pulslu manyetik alan uygulama sisteminin genel görünümü.

3.5 Performans Testleri

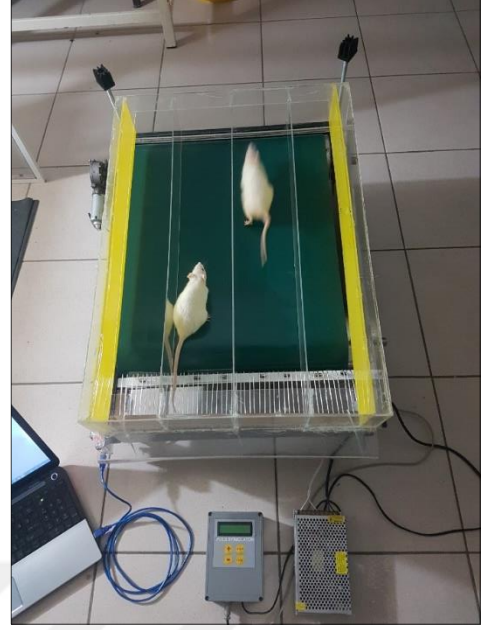
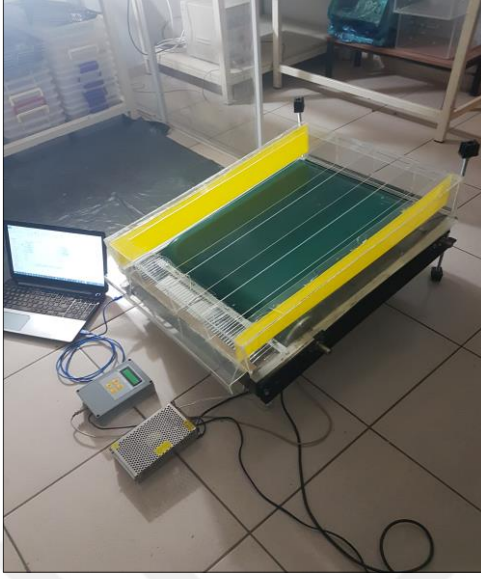
Haftada bir kez, sıçanlar koşu bandı sisteminde fiziksel teste tabi tutularak kas yorgunluk ve performansları ölçüldü. Koşu bandı testinin sıçanların kas fiziksel gelişimine katkısını en aza indirmek ve daha çok uygulanacak yöntemlerin etkilerini gözlemlemek adına sadece haftada bir kez yapıldı. Bu çalışmada sıçan koşu bandı sistemini kullanabilmek için, piyasada satışa sunulan orijinal sistemlerin teknik özelliklerini temel alarak, Anabilim Dalı'mızda ön çalışmasını yapıp, uğraşlarımız sonucu Adana Organize Sanayii Bölgesinde yeni bir cihaz yaptırdık. Sıçan koşu bandı sistemi -25/+25 derecede eğimi ayarlanabilir kasnak sistemi üzerine monte edildi. Sıçanların koşu bandı sisteminde kalmalarını sağlamak için başlangıç bölgesinin arka kısmına ($-x=8$ cm) düşük voltajlarda AC elektriksel şok verebileceğimiz 40 cm uzunluğunda ızgaralar döşendi. Izgaralara verilecek elektriksel şok, 0-10 Hz, 0-2 mA aralığında istenen değerlerde ayarlayabileceğimiz programlanabilir bir stimülatör yardımıyla kontrol edilebilmektedir. Ayrıca, cihazı tasarlarken, örneğine rastlamadığımız bir yardımcı düzenek eklendi; sıçanların ortama alıştıktan sonra koşu bandında koşmaya başladıkları andan yorgunluk belirtilerinin görüldüğü ve koşmayı bıraktıkları ana kadar geçen süre ızgaraların altına yerleştirilen sensörler yardımıyla kaydedilebilmektedir.

Arduino yazılımı ile bilgisayara aktarılarak eş zamanlı ve daha hassas süre takibi yapılabilmektedir. Bandın dönmelerini sağlayan motor hızı kontrol edilebilir (0-90 m dk⁻¹, hassasiyet; 0.50 m dk⁻¹). Koşu bandı uygulama protokolü önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi (175). Özetle, ilk olarak sıçanlar ortama alışmaları için % 0 derece eğimde ve 10 m dk⁻¹ hızında 5 dakika boyunca çalışan koşu bandında tutuldu. Daha sonra % 10 eğimde 10 m dk⁻¹ hızında 5 dakika boyunca koşturuldu. Her 2 dakikada bir sıçanlar yorulana kadar koşu bandı hızı 2 m dk⁻¹ oranında artırıldı ve sonunda koşma süresi ve hızları kaydedilerek, koşma mesafesi hesaplandı.

Sıçanlarda yorgunluk oluşma kriteri; sıçanlar koşu bandının arka tarafına yerleştirilen 1,2 mA ve 3 Hz frekansta AC akım veren 8x8 cm² ızgaralar üzerine temas ettiğinde 1,5 saniye içerisinde ileriye doğru hareket etti ve koşu bandı üzerinde tutundu. Sıçanlarda yavaş yavaş yorgunluk oluşmasına bağlı olarak 3. defa 3 saniyeden fazla ızgara üzerinde kalıp ileriye doğru hareket tepkisi vermemesi yorgunluğun oluşması olarak kabul edildi ve sıçanlar koşu bandı üzerinden kaldırıldı (176).



Şekil 3.7 Koşu bandı sistemi şematik gösterimi.



Şekil 3.8 Sıçan koşu bandı ve kayıt sistemi.

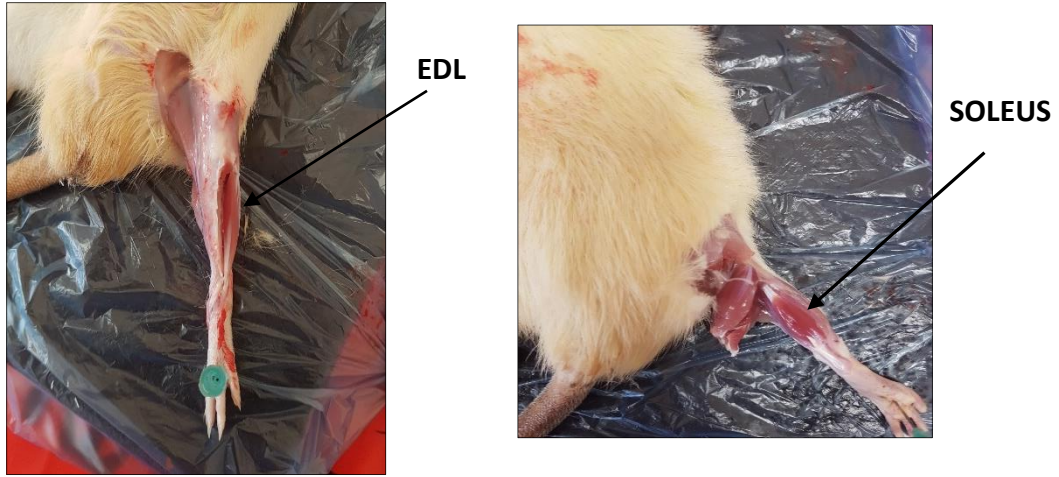
3.6 Biyomekanik Kayıtlamalar

3.5.1 Solüsyonların Hazırlanması

Biyomekanik kayıtlamalar için organ banyosu içerisine önceden hazırlanan krebs solüsyonu kullanıldı. Krebs solüsyon içeriği; 118 mM NaCl, 4,69 mM KCl, 0,6 mM $MgSO_4$, 1,17 mM KH_2PO_4 , 11,1 mM Glikoz, 25,0 mM $NaHCO_3$ ve 2,5 mM $CaCl_2$ ve pH ~7,4 olarak ayarlandı. Organ banyosu sürekli olarak % 95 Oksijen (O_2)+% 5 karbondioksit (CO_2) ile gazlandırıldı.

3.5.2 Soleus ve EDL Kas Preparatlarının Hazırlanması

Sıçanlar Ketamin HCl (80 mg/kg, Ketalar, Pfizer) ve Ksilazin (20 mg/kg, Rompun % 2, Bayer) birleşiminden oluşan anestezi ile uyutulduktan sonra kalplerinden kan çekme yoluyla sakrifiye işlemine tabii tutuldular. Daha sonra sağ bacak soleus ve EDL kasları sürekli krebs solüsyonuyla ıslatılarak dissekte edildi. Kaslar distal ve proksimal uçlarından iplerle bağlanarak organ banyosu içerisine yerleştirildi. Kaslardan en kısa sürede kasılma yanıtlarının kayıtlanabilmesi için iki organ banyosu eş zamanlı kullanıldı.



Şekil 3.9 Soleus ve EDL kaslarına ait görüntüler.

3.5.3 Kasılma Yanıtlarının Kaydedilmesi

Kaslar optimum gerginlikte olacak şekilde organ banyosuna yerleştirildi, ~30 dakikalık bir termoregülasyon ve dengelenme süresinden sonra, tek sarsı izometrik kasılma değerlerini kaydetmek için 0.5 ms (15-20 V) süreli 1 Hz kare pulslarla supramaksimal olarak uyarıldı. Uygulamalar arası ~30 dakika beklenerek 0.5 ms süreli 10, 20, 50 ve 100 Hz (15-20 V) frekanslı kare pulslarla 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 (P_t , g-kuvvet), kasılma süresi (CT, ms), gevşeme süresi (RT, ms) ve tetanik kasılma kuvveti (P_o , g-kuvvet) şeklinde kasılma yanıtları alındı. Kasılma yanıtları kaydedildikten sonra kasların nemli ağırlıkları kaydedildi. Kasılma kuvvetleri ve parametrelerinin kayıtlanmasında Biopac MP30 cihazı, MAY organ banyosu (MAY WBC3044), MAY ISO-150 stimülatör ve MAY su ısıtıcı sirkülatörü kullanıldı. Veriler Biopac Student Lab Pro v 3.6.7 programı ile analiz edildi.



Şekil 3.10 Biyomekanik Kayıt Sistemi.

3.7 ELİZA Analizleri

3.7.1 Doku Homojenizasyonu

Sakrifiye edilen sıçanların soleus ve EDL kasları 100-150 mg parçalara ayrılıp eppendorf tüpler içinde -80 °C’de saklandı. Daha sonra analiz günü kas dokularındaki hücrelerin parçalanıp proteinlerin serbest kalması için aşağıda belirtildiği şekilde taze olarak homojenizasyon sıvısı hazırlandı;

- a) 1 gram doku için 10 mL RIPA buffer (w:v, 1:10) denk gelecek şekilde boş bir falkon tüpe (50 mL) RIPA buffer (Boster, USA) solüsyonu ayrıldı. RIPA buffer içeriği; 50 mM Tris HCl pH=7.6, 150 mM NaCl, % 1 NP-40, % 1 sodium deoxycholate, % 0.1 SDS
- b) 1 mL RIPA için 1 mM PMSF’den (Phenylmethanesulfonyl fluoride, % 99, Acros Org.) 100 uL (v:v, 1:100) oranında eklendi.
- c) 1 mL toplam RIPA+PMSF karışımı için 1 mM sodyum ortovanadat’dan (Sodium orthovanadate, % 99, Acros Org.) 100 uL (v:v, 1:100) oranında eklendi.
- d) 1 mL toplam RIPA+PMSF+Sodyum ortovanadat karışımı için 1X Proteaz inhibitör kokteylinden (Abbkine) 100 uL (v:v, 1:100) oranında eklendi.
- e) -80°C’den çıkarılan dokular seramik havan içerisinde üzerlerine sıvı azot dökülerek iyice parçalandı. Toz haline getirilen dokular, buz dolu köpük kutular içerisine gömülmüş steril borosilikat cam tüplere alınarak üzerlerine hazırlanan homojenizasyon sıvısından eklendi ve steril baget çubuklarla iyice ezilerek homojenizatların elde edilmesi sağlandı.
- f) Homojenizatlar steril eppendorf tüplere aktararak, 10000 RPM’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatantlar toplanarak yeni steril tüplere aktarıldı.



Şekil 3.11 Sıvı azot içerisinde parçalanmış kas dokusu.

3.7.2 Bradford Toplam Protein Tayini

Total protein tayini Bradford solüsyonu (Serva, 5X) ve Bovin serum albumin (BSA, pH 7.0 lyophil, Serva) kullanılarak hesaplandı. Solüsyonu kullanmadan önce birkaç defa ters çevirerek homojenizasyon sağlandı. 5X konsantrasyondaki Bradford solüsyonu 2:7.5 oranında distile suyla seyreltildi.

a) Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için BSA referans solüsyonu distile suyla seyreltilerek standartlar hazırlandı; standart 1 (20 µg/mL), standart 2 (30 µg/mL), standart 3 (40 µg/mL), standart 4 (50 µg/mL), standart 5 (60 µg/mL), standart 6 (80 µg/mL), standart 7 (100 µg/mL).

b) 50 µL distile su blank kuyucuğuna eklendi.

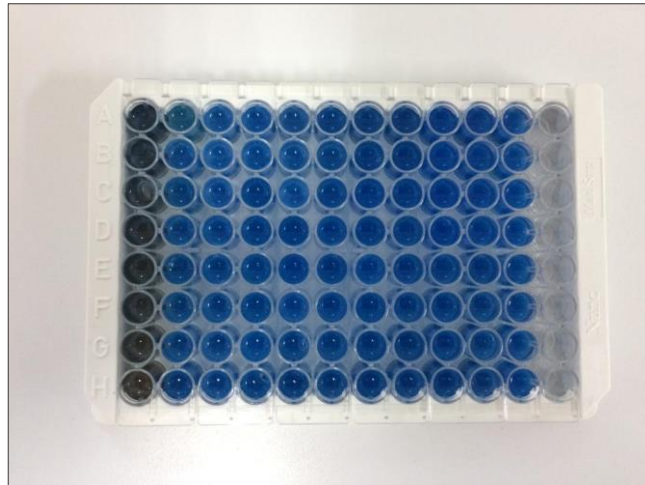
c) Hazırlanan standart solüsyonlarından 50 µL çekilerek standart kuyucuklarına eklendi.

d) Protein tayini yapılacak örneklerden 50 µL çekilerek örnek kuyucuklarına eklendi.

e) Daha sonra bütün kuyucukların üzerine 200 µL Bradford solüsyonundan eklendi.

f) 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi

g) 595 nm dalga boyuna absorbans değerleri okundu.



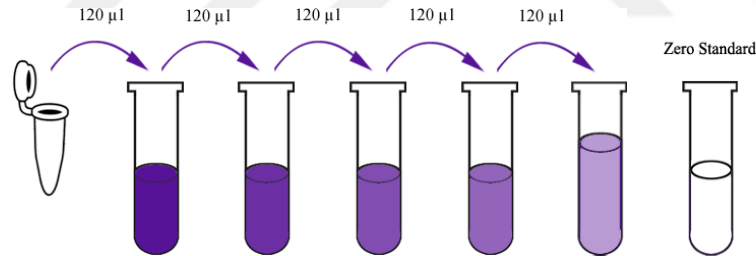
Şekil 3.12 Bradford protein tayini için yüklenen Eliza plate.

3.7.3 Eliza Platelerin Hazırlanması

Dokular homojenize edildikten sonra, eliza kitlerin kullanma talimatlarına göre absorbands ölçümleri yapıldı. p-Akt, mTOR, FOXO3a, Myostatin (MSTN), MyHC4, Glut-4, TNF- α ve kalpain-3 (CAPN-3) ve serum insülin eliza kitleri için BT Lab (UK) ürünleri kullanıldı. Birbirine çok benzer aşamaları tekrarlamak yerine aşağıda örnek temsil etmesi için MyHC 4 (MyHC IIb) için protein tayin aşamaları anlatıldı:

a) -80 °C'den çıkarılan homojenatlar ve kit bileşenleri buz üzerinde çözülünceye kadar beklendi. Kutu içerisinden çıkan 120 μ L standart solüsyonu (16 ng/mL), 120 μ L standart seyreltici ile dilüe edildi ve 240 μ L hacimde 8 ng/mL miktarda standart stok solüsyonu hazırlandı.

b) Standart stok solüsyonu oda sıcaklığında 15 dakika dinlendirildikten sonra, standart seyreltici kullanılarak 1:2 oranında seri dilüe edilerek standart tüpler hazırlandı. Standart 0 (0 ng/mL), Standart 1 (0.5 ng/mL), Standart 2 (1 ng/mL), Standart 3 (2 ng/mL), Standart 4 (4 ng/mL), Standart 5 (8 ng/mL).



Şekil 3.13 Eliza analizlerinde kullanılacak stok (referans) solüsyonların hazırlanması.

c) Yıkama solüsyonu; 25X yoğunlukta olan 20 mL yıkama solüsyonu 500 mL distile su ile karıştırılarak 1X yapıldı.

d) Mikroplate üzerinde standart, blank ve örnek kuyucukları belirlendi. Analizler üçlü tekrarlı olarak yapıldı.

e) Hazırlanan standart 0-1-2-3-4-5 tüplerinin her birinden 50 μ L çekilerek ilgili standart kuyucuklarına yüklendi. Blank kuyucuğu boş bırakıldı.

f) Homojenatların her birinden 40 μ L çekilerek örnek kuyucuklarına yüklendi.

g) 10 μ L anti-MyHC4 örnek kuyucuklarına eklendi. Standart solüsyonlar biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuklarına eklenmedi.

h) 50 μ L streptavidin-HRP hem örnek kuyucuklarına hem de standart kuyucuklara eklendi.

i) Plate üzeri membranla kapatıldıktan sonra, Eliza Plate Okuyucu (Multiskan Go, USA) içerisine alındı ve ilk önce 5 dakika orbital çalkama yapıldıktan sonra 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

j) İnkübasyondan sonra eliza plate üzerinden membran çıkarıldı ve 8 kanallı mikro pipet yardımıyla önceden hazırlanan yıkama solüsyonu kullanılarak eliza plate 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kurulama için steril absorban kağıtlar kullanıldı.

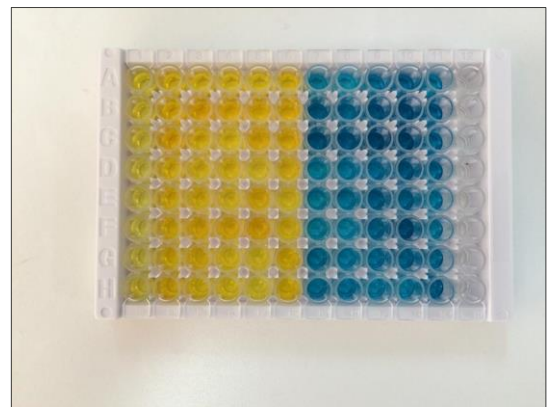
k) Daha sonra 50 μ L substrat solüsyon A ve 50 μ L substrat solüsyon B her bir kuyucuğa eklendi.

l) Eliza plate yeni bir membranla kapatıldı ve plate okuyucu içerisinde 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

m) İnkübasyon sonrası, her bir kuyucuğa 50 μ L stop solüsyonu eklendi ve mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.

n) Eliza plate daha sonra absorban ölçümleri için plate okuyucu içerisine yerleştirildi ve 450 nm'de okumalar yapıldı.

o) Plate okuyucu içerisindeki program yardımıyla standart eğrileri oluşturuldu ve protein konsantrasyonları belirlendi.



Şekil 3.14 Eliza plate okuyucu genel görünüm (sol), absorban ölçümü için hazırlanan plate (sağ).

3.8 Real Time qPCR Analizleri

Çalışmamızda, MuRF1, MAFbx, FOXO3a ve 4EB-1 gen ekspresyon analizleri için hayvanlar sakrifiye edildikten sonra soleus ve EDL kasları 30 mg'lık parçalara ayrılarak steril eppendorf tüplere alındı ve üzerlerine 10 kat hacimde (300 µL) RNA koruyucu solüsyon (Biological Industries, İsrail) eklendi. RNA koruyucu solüsyon sayesinde dokular -20 °C'de uzun süreli saklandı.

3.8.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Zymo Research Direct-zol™ RNA Miniprep Plus kiti kullanıldı. RNA izolasyonu yapmadan önce, sert dokulardan olan iskelet kas dokularının homojenizasyonu kit içerisinde çıkan TRI Reagent ile yapıldı; RNA koruyucu içerisinde saklanan (~30mg) kas dokusu nükleaz'dan arındırılmış tüp içerisine alındı ve üzerine 800 µL TRI Reagent eklendi. Daha sonra tüp içerisine metal bilye atılarak doku parçalayıcıda (TissueLyser II, Qiagen) 25 Hz, 2 dakika süreyle parçalanması ve tam homojenize olması sağlandı. Metal bilye çıkarıldıktan sonra, tüpler 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar toplandı (~800 µL) ve RNA izolasyon işlemlerine bu örneklerle devam edildi.

a) 40 mL % 95 etanol ile 160 mL Direct-zol™ RNA PreWash solüsyonu karıştırıldı.

b) 208 mL % 95 etanol ile 48mL RNA Wash solüsyonu karıştırıldı.

c) 1500 U DNase I (toz halinde) ile 275 µL DNase/RNase içermeyen Water karıştırıldı ve stok solüsyon elde edildi.

d) TRI Reagent içerisinde çözündürülmüş süpernatant örnekle (~800 µL) eşit hacimde % 95 etanol eklendi. Hazırlanan karışım toplama tüpü içerisindeki Zymo-Spin™ IIICG kolonuna aktarıldı ve 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine alındı.

Tavsiye edilen DNase I uygulaması yapıldı;

-400 µL RNA Wash solüsyonu kolona eklendi ve 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.

-Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine alındı.

-RNase free tüp içerisinde 5 µL (6 U/µL) DNase I (c'de anlatıldığı gibi dilüe edilen stok solüsyondan) ve 75 µL DNA parçalayıcı solüsyon karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan bu karışım kolon içerisine eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı

e) Kolona 400 µL Direct-zol™ RNA PreWash eklendi ve 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu adım 2 defa yapıldı. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine alındı.

f) Kolona 700 µL RNA Wash solüsyonu eklendi ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra kolon dikkatli bir şekilde RNase free tüp içerisine yerleştirildi.

g) Kolon içerisindeki filtrasyonla çeperlere tutunan RNA'yı ayırtırmak için, 60 µL DNase/RNase içermeyen Water kolon içerisine eklendi ve 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası RNase free tüpümüzde biriken 60 µL hacimdeki solüsyondan RNA eldesi gerçekleştirdik

RNA'larımızın saflık ve miktarını tayin için Multiskan Go cihazıyla uyumlu µDrop Plate (Thermo Scientific, USA) kullandık. µDrop Plate üzerindeki örnek kuyucuklarına 1 µL elde ettiğimiz serumdan (doku homojenatı) ve referans kuyucuğuna da 1 µL DNase/RNase içermeyen sudan ekledik. RNA konsantrasyonu ~120 µg/mL ve RNA saflık (A260/A280) oranı ~1,7 olarak bulundu.



Şekil 3.15 Kas dokularının parçalanması için kullanılan doku parçalayıcı (sol) ve Trizol ile muamele sonrası homojenize olmuş kas dokusu (sağ).

3.8.2 cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi abmGood OneScript® Plus cDNA Sentez Kit'i kullanılarak yapıldı

a) -80 °C'den çıkarılan RNA örnekleri ve kit bileşenleri buz üzerinde çözünmeye bırakıldı ve reaksiyon karışımları aşağıdaki Çizelge 3.1'e göre hazırlandı;

Çizelge 3.1 cDNA sentez kit bileşenlerinin hazırlanması.

cDNA Sentez Kit Bileşenleri	Hacim	Son Konsantrasyon
Toplam RNA	10 µL	1 ng-2 µg/reaksiyon
Random Primerler (10 uM)	1 µL	0.5 µM
dNTP (10 mM)P	1 µL	500 µM
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2.5 µL	-
5X RT Buffer	4 µL	1X
RNaseOFF Ribonükleaz İnhibitör (40 U/µL)	0.5 µL	20 U/reaksiyon
OneScript RTase (200 U/µL)	1 µL	200 U/reaksiyon
Toplam	20 µL	

Daha önce RNA izolasyonu ile her bir tüpte ~120 µg/mL yoğunlukta RNA elde etmiştik. cDNA sentez kitinde toplam RNA miktarının 1 ng-2 µg/reaksiyon arasında olması istendiğinden karışım hazırlanırken her bir reaksiyon için uygun hacim olan 10 µL (~1.2 µg) kullanıldı.

b) PCR tüplerinin içerisinde toplam 20 µL'lik karışımlar hazırlandı. Pipetleme ve düşük hızda santrifüj yapıldı. Daha sonra cDNA eldesi için, PCR tüpleri Thermal Cycler (Applied Biosystems Veriti) cihazında aşağıdaki protokole tabii tutuldu.

Çizelge 3.2 Thermal Cycler cDNA sentez protokolü.

	I. Aşama	II. Aşama	III. Aşama	IV. Aşama
Sıcaklık	25 °C	42 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dakika	50 dakika	5 dakika	∞

c) Elde edilen cDNA örnekleri, -20 °C'de saklandı.

3.8.3 Real Time qPCR Analizler

Real Time qPCR analizlerinde, Metabion (Almanya) firmasında hazırlatılan primerler (1 çift, ortalama 25 baz, 40 nmol) ve Promega'nın GoTaq® qPCR Master Mix kiti kullanıldı.

a) cDNA örnekleri ve kit bileşenleri buz üzerinde çözdürüldü.

b) Toplam 300 µL Nükleaz içermeyen suda 100 pmol/µL yoğunlukta stok primerler hazırlandı.

c) Stok primerden 30 µL alındı ve 270 µL Nükleaz içermeyen su ile karıştırıldı. Son yoğunluk 1:10 oranında dilüe edilerek 10 pmol/µL karışım elde edildi. Master Mix hazırlanırken bu primer yoğunluğu kullanıldı. Master Mix karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Çizelge 3.3 Master Mix hazırlama protokolü.

qPCR Master Mix Bileşenleri	Hacim	Son Konsantrasyon
GoTaq® qPCR Master Mix (2X)	10 µL	1X
Forward Primer	2 µL	200 nM-1uM
Reverse Primer	2 µL	200 nM-1uM
CXR Referans boyası	0.2 µL/reaksiyon	300 nM
cDNA örneği	1 µL	-
Nükleaz içermeyen su	4.8 µL	-
Toplam	20 µL	-

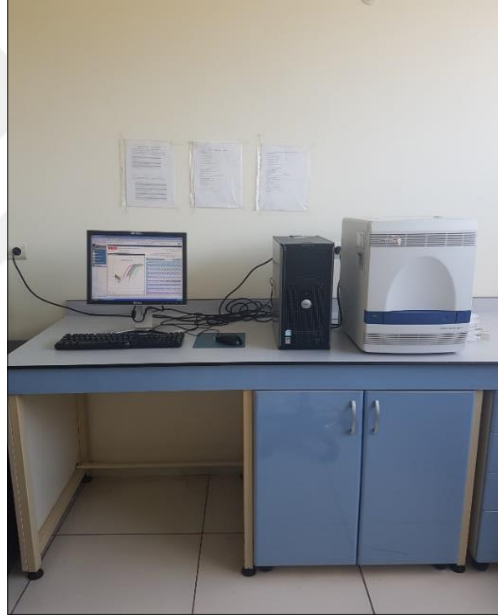
d) Hazırlanan karışımlar, 96'lık qPCR plate içerisine eklendi. Örnekler 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Plate şeffaf yapışkan film (New Bioscience) ile kapatıldı ve aşağıdaki döngü programında çalışılmak üzere Applied Biosystems 7500 Real Time qPCR (Thermo Fisher) cihazına yerleştirildi.

Çizelge 3.4 Real Time qPCR döngü protokolü.

Aşama	Döngü	Sıcaklık	Zaman
Polimeraz Aktivasyonu	1	95 °C	2 dakika
Denatürasyon	40	95 °C	15 saniye
Birleşme ve Uzama		60 °C	1 dakika

Çizelge 3.5 mRNA gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primerler.

Primerler		5' → 3'
4E-BP1	Forward	GGACCTGCCAACCATTCCAG
	Reverse	GGGAGGCTCATCGCTGGTAG
MAFbx (FBXO32)	Forward	CCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTT
	Reverse	GCTTCCCCCAAAGTGCACTA
MuRF-1 (TRIM63)	Forward	GCTGCCAATCCCTACTGGAC
	Reverse	CATGATCACTTCATGGCGGC
FOXO3a	Forward	TCTCCCGTCAGCCAGTCTAT
	Reverse	AGTCACTGGGGAAGTGTCTG



Şekil 3.16 Real Time qPCR kayıt sisteminin genel görünümü.

3.8.3.1 $\Delta\Delta C_T$ Metodu

4E-BP1, MAFbx, MuRF1 ve FOXO3a genlerine ait mRNA ekspresyon miktarlarına tayin etmek için $\Delta\Delta C_T$ yöntemi kullanıldı. C_T çoğaltılan gendeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı temsil eder.

$$\Delta C_T = C_T (\text{Hedef Gen}) - C_T (\text{Referans Gen})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Örnek}) - \Delta C_T (\text{Kontrol})$$

$$\text{Oran} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.9 Işık Mikroskopi Yöntemi

Işık mikroskopik incelemeler için bütün graplardan alınan kas doku örnekleri % 10'luk nötral formalin içerisinde koyuldu ve 3 gün boyunca bekletildikten sonra tespit gerçekleştirildi. Daha sonra formalinin uzaklaştırılması için dokular distile su ile yıkandı ve Leica TP 1020 Ototeknikon Cihazı ile aşağıdaki Çizelge 3.6'da belirtilen doku takip yöntemi uygulandı.

Çizelge 3.6 Doku takibi için uygulanan protokol.

Sıcaklık	İşlem	Zaman
Oda sıcaklığı	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığı	% 70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığı	% 80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığı	% 90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığı	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığı	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığı	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığı	Saf alkol+ksilol	1 saat
Oda sıcaklığı	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığı	Ksilol	1 saat 30 dakika
60 °C'de	Parafin	1 saat
60 °C'de	Parafin	1 saat 30 dakika
Bloklama		

Bloklama işlemini takiben mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınan histolojik kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Olympus BX53 ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları alındı. Bloklardan ayrıca immünohistokimyasal incelemeler için de doku kesitleri alındı ve uygun yöntemlerle hazırlandı.

3.10 İmmünohistokimya Analizleri

FBXO32 (MAFbx), MuRF-1 ve FOXO3a immünokimyasal aktivite belirlenmesi için histolojik kesitler, polilizin kaplı lamlar üzerine alındı. Buzdolabında bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce kurutularak, tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika kadar bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar kurutulan kesitler, 60 °C'de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra doku kesitleri, oda ısısında ksilol serilerinden geçirildi ve derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildikten sonra distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu (pH:6) içerisine alınarak 95°C'lik su banyosunda, 30 dakika süreyle tutuldu ve antijenlerin açığa çıkarılması işlemi gerçekleştirildi. Oda ısısında 45 dakika soğutulan kesitler, distile suda (dH₂O) yıkandı ve % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisine alındı. dH₂O'de yaklaşık 10 dakika kadar bekletildikten sonra, saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin üzerine non-spesifik bağlanmayı engellemek amacıyla bloklama solüsyonu damlatıldı ve oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra, saf su ve fosfat tamponundan geçirildi. Daha sonra anti-FBXO32 (FBXO32; anti-rat polyclonal antibody, PA5-76680, Thermo Fisher, USA), anti-MuRF-1 (MuRF-1; anti-rat polyclonal antibody, PA5-96226, Thermo Fisher, USA), ve anti-FOXO3a (FOXO3a; anti-rat polyclonal antibody, PA5-19519, Thermo Fisher, USA) primer antikorları damlatıldı. Primer antikor damlatılan tüm kesitler +4°C'de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikorlar yerine, tampon solüsyonu damlatıldı. Primer antikorla muamele edilip 1 gece +4°C'de ve ardından 1 saat oda sıcaklığında bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS'den geçirildi ve üzerlerine Biotin solüsyonu damlatılarak 15 dakika oda ısısında tutuldu. 15 dakika sonra distile su ve PBS'de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin solüsyonu damlatılarak, 20 dakika oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitler üzerine, aminoetilkarbozol (AEC) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu içerisinde yıkandı ve doku kesitleri, zıt boyama için Hematoksilen ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı. Kesitler Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.11 İstatistiksel Analizler

Deney gruplarından elde edilen veriler ortalama±standart hata olarak ifade edildi. Her grupta n=10 hayvan olacak şekilde ayarlandı. Normal dağılım testi, Kolmogorov-Smirnov 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 Microsoft Excel ve Graphpad Prism 8.30 programı ile yapıldı. Ayrıca $-\log_{10}$ (p-değerleri) ve $\log_2$ (protein konsantrasyon) değerlerine karşılık gelen p-volkan grafik dağılımları da Graphpad Prism 8.30 programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

Tip 1 diyabetli hayvanlara uygulanan antioksidan (pterostilben ve resveratrol) ve pulslu manyetik alan uygulamalarının karşılaştırmalı etkileri istatistiksel ve morfolojik olarak değerlendirildi.

4.1 Vücut ve Kas Ağırlık Değişimleri

5 haftalık deney süresi boyunca haftada bir kez gruplardaki sıçanların ağırlıkları tartıldı ve ortalama ağırlık $\pm$ standart hata (SH) olarak ifade edildi (Çizelge 4.1).

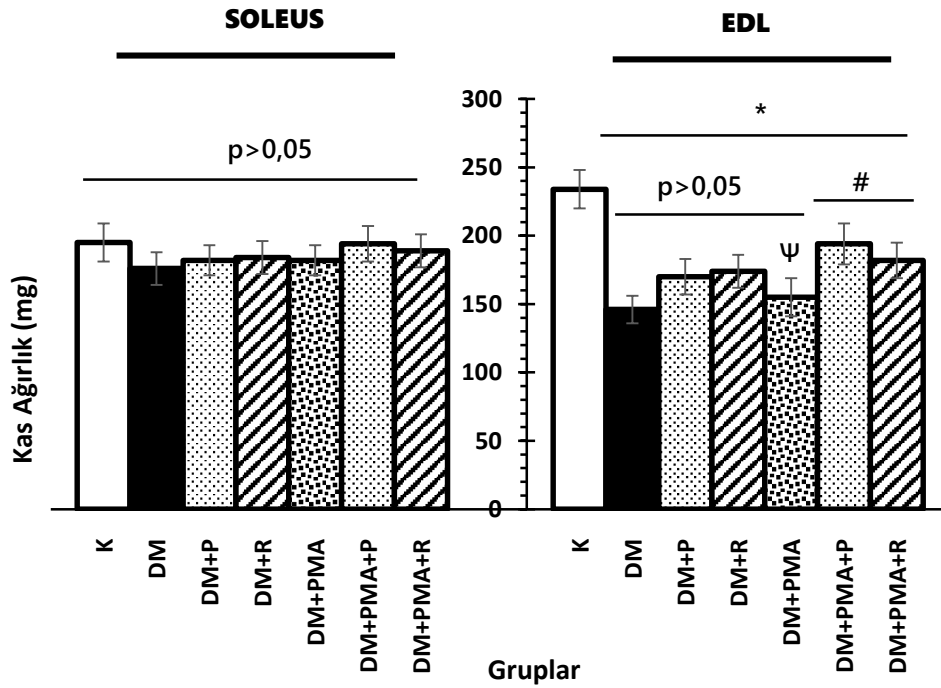
Çizelge 4.1 Deney gruplarındaki hayvanların ortalama ağırlık değişimleri

Deney Grupları (n=10)	Ortalama Ağırlık Değişimleri (g)						
	Haftalar						Ortalama±SH
	0	1	2	3	4	5	
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+P [#]	390±3,6	372±3,8	370±4,7	375±3,7	383±4,3	394±3,9	381±4,1
DM+R [#]	385±3,7	358±3,9	360±4,1	364±4,4	368±4,8	375±3,8	368±4,2
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+P [#]	385±7,8	375±6,8	378±6,9	392±6,7	405±7,0	421±7,4	393±7,2
DM+PMA+R [#]	392±4,1	368±4,3	370±5,2	380±4,8	386±4,4	395±4,3	382±4,6

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

Deney sonunda (5.hafta), diyabetik sıçanların kontrol grubuna göre yaklaşık % 30 vücut ağırlık kaybına uğradığı görüldü. Diyabetik sıçanlara antioksidan ve PMA uygulamalarının, hiçbir şey uygulanmayan DM grubuna kıyasla anlamlı olarak farklılık gösterdiği belirlendi ($p<0,05$). Antioksidan ve PMA grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$).

Deney sonunda sıçanlardan çıkarılan soleus ve EDL kas ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü ve istatistiksel olarak gruplar karşılaştırıldı. Kontrol grubuna göre diyabetik EDL kas ağırlıklarının diyabetik soleus kas ağırlıklarına göre daha fazla ağırlık kaybına uğradığı tespit edildi. Bu durum EDL kaslarında gelişen atrofinin soleus kaslarına göre daha şiddetli olabileceğine yorumlandı.



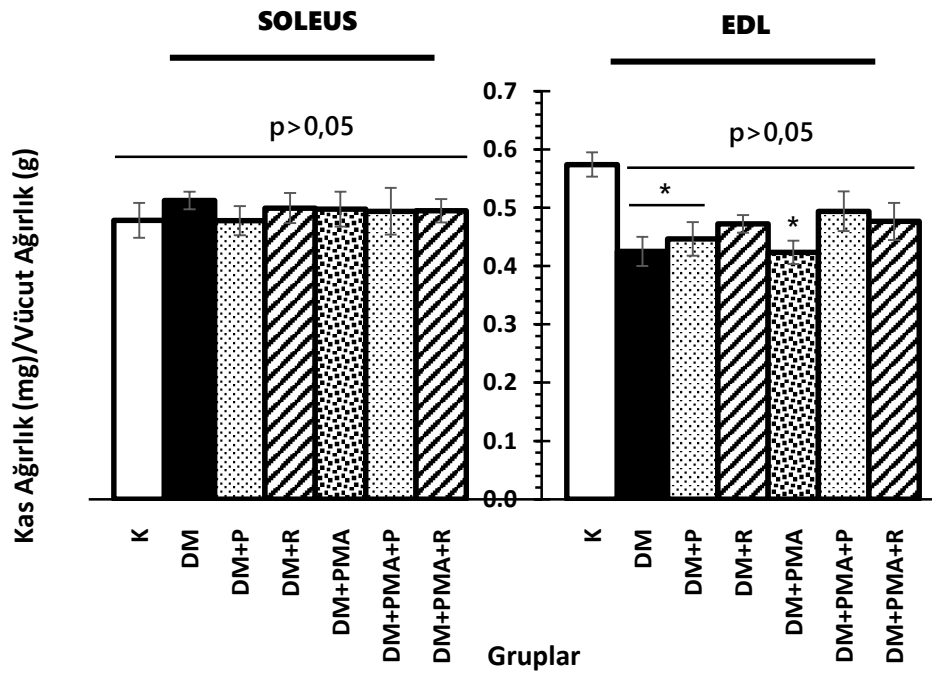
Şekil 4.1 Deney sonunda soleus ve EDL kaslarına ait nemli ağırlık değişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), Ψ DM+PMA+P grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Soleus kas ağırlık değişimlerinde anlamlı farklılıklar gözlenmezken, EDL kaslarında anlamlı farklılıklar görüldü. DM+PMA+P grubundaki sıçanların EDL kaslarındaki ağırlık değişimi DM+PMA grubundan anlamlı olarak farklı bulundu ($p>0,05$).

Soleus kaslarında; DM grubuna göre kas ağırlığında en fazla artış (% 10,23) DM+PMA+P grubunda, en az artış DM+P ve DM+PMA (% 3,41 ve % 3,39) gruplarında gözlemlendi. DM grubuna göre, antioksidan etkinlikleri karşılaştırılmasında ise DM+R (% 4,55) uygulamasının DM+P'den (% 3,41) daha fazla kas ağırlığını artırdığı bulundu.

EDL kaslarında; DM grubuna göre kas ağırlığında en fazla artış (% 32,88) DM+PMA+P grubunda, en az artış DM+PMA (% 6,16) grubunda gözlemlendi. DM grubuna göre, antioksidan etkinlikleri karşılaştırılmasında ise DM+R (% 19,18) uygulamasının DM+P'den (% 16,44) daha fazla kas ağırlığını artırdığı bulundu.

STZ indüklenmesiyle birlikte EDL kaslarındaki ağırlık kaybı soleus kaslarına göre daha fazla olmasına rağmen, uygulanan yöntemlerle birlikte EDL kaslarında ağırlık geri dönüşümünün soleus kaslarına göre daha fazla olduğu gözlemlendi.



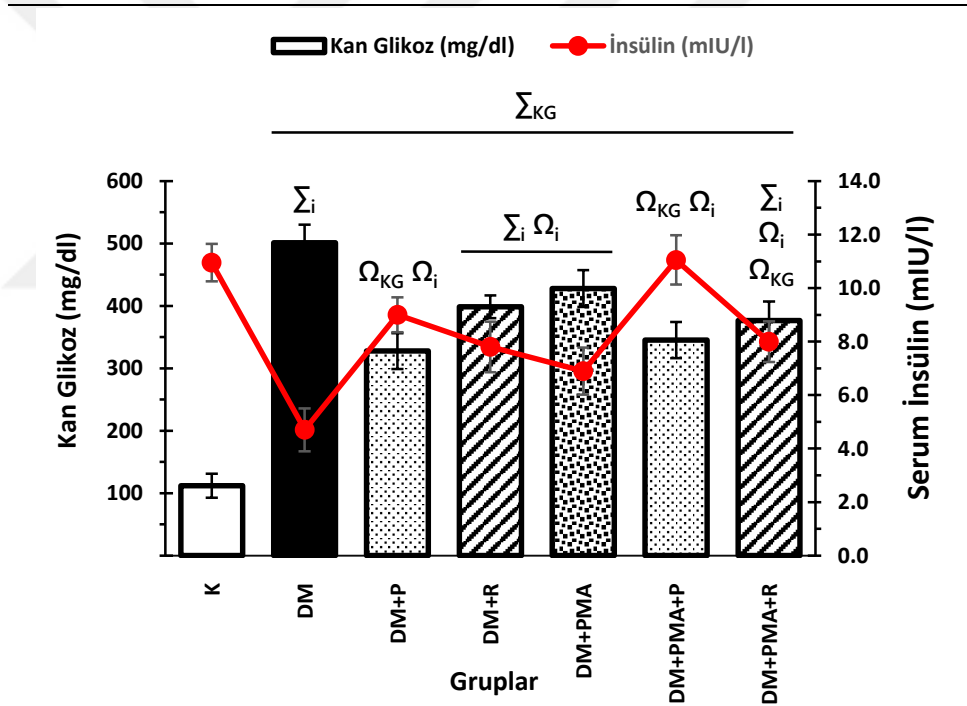
Şekil 4.2 Soleus ve EDL kaslarına ait nemli ağırlık ve vücut ağırlıkları oranları. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), Ψ DM+PMA+P grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Kontrol grubuna göre DM grubundaki sıçanların vücut ağırlık değişimlerine göre soleus ve EDL kas ağırlık değişimlerine bakıldığında, DM grubundaki sıçanların soleus kaslarındaki ağırlık kaybının vücut ağırlık kaybına göre daha az olduğu ve kas kütlesinin nispeten korunduğu gözlemlendi.

Benzer kıyaslama EDL kasları için yapıldığında, EDL kaslarındaki ağırlık kaybının vücut ağırlık kaybına oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Gruplar, soleus kas ağırlık değişimleri ve vücut ağırlık değişimleri oranına göre kıyaslandığında anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($p>0,05$). EDL kas ağırlık ve vücut ağırlık değişim oranına göre kıyaslandığında ise, antioksidan ve PMA uygulanan grupların DM'ye göre ve kendi aralarında anlamlı farklılık göstermediği ama DM, DM+P ve DM+PMA gruplarının K'ya göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$).

4.2 Kan Glikoz ve Serum İnsülin Değerleri

Sıçanların periyodik olarak her hafta sonu kan glikoz seviyeleri glikometre yardımıyla ölçüldü.



Şekil 4.3 Deney sonunda gruplara ait ortalama kan glikoz ve serum insülin seviyeleri.

Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. Σ_{KG} (Kan Glikoz) ve Σ_i (insülin) K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), Ω_{KG} (Kan Glikoz) ve Ω_i (insülin) DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

5 hafta boyunca haftada bir ölçülen kan glikoz değerleri ortalaması alındı ve standart hata payı ile verildi. Elde edilen bulgulara göre STZ indüklenmesiyle birlikte DM grubu kan glikoz seviyesi K grubuna göre % 347,32'lik bir artış gösterdi.

Diğer grupların DM grubuna göre kan glikoz seviyelerindeki azalma oranı; DM+P (% 34,60) > DM+PMA+P (% 31,10) > DM+PMA+R (% 24,83) > DM+R (% 20,43) > 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 seviyelerini hangi oranda artığına bakıldığında; DM+PMA+P (% 135,11) > DM+P (% 91,49) > DM+PMA+R (% 70,21) > DM+R (% 65,96) > DM+PMA (% 46,81) olarak bulundu.

Gruplar arasında anlamlılık düzeyi karşılaştırması aşağıdaki Çizelge 4.2’de verildi.

Çizelge 4.2 Grupların Kan Glikoz ve Serum İnsülin değerlerinin karşılaştırılması

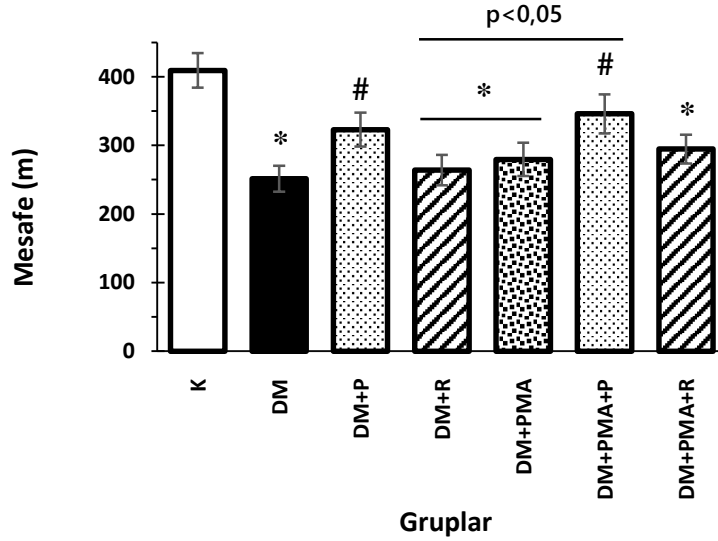
KAN GLİKOZ							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0005	p=0,0001	p=0,0002	p=0,0008	p=0,0007	p=0,0010
DM			p=0,0206	p=0,0955	p=0,3021	p=0,0226	p=0,0450
DM+P				p=0,0756	p=0,0210	p=0,5005	p=0,3171
DM+R					p=0,7892	p=0,3228	p=0,5682
DM+PMA						p=0,2641	p=0,4008
DM+PMA+P							p=0,7044
DM+PMA+R							

SERUM İNSÜLİN							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0094	p=0,2678	p=0,0309	p=0,0132	p=0,9317	p=0,0376
DM			p=0,0007	0,0029	p=0,0098	p=0,0004	p=0,0025
DM+P				p=0,3869	p=0,0439	p=0,0756	p=0,3939
DM+R					p=0,4938	p=0,0090	p=0,8637
DM+PMA						p=0,0035	p=0,2447
DM+PMA+P							p=0,0373
DM+PMA+R							

Pterostilben antioksidan uygulamasının hem kan glikoz hem de serum insülin seviyelerini iyileştirmede daha etkili olduğu görüldü. Ayrıca PMA uygulamasının tek başına antioksidan uygulamaları kadar etki etmediği fakat antioksidan uygulamalarıyla birlikte PMA kullanımının daha etkili olduğu görüldü.

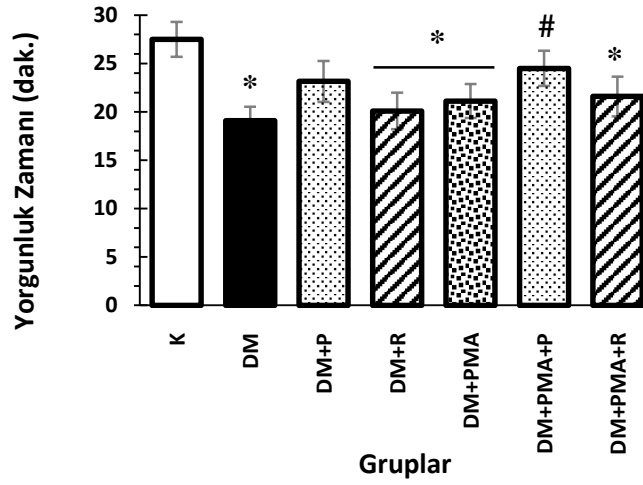
4.3 Koşu Bandı Performans Testlerinin Değerlendirilmesi

Sıçanlar haftada bir kez koşu bandı üzerinde performans testlerine tabii tutuldu ve gruplar arasındaki farklılıklar mesafe ve yorgunluk zamanı olarak karşılaştırıldı.



Şekil 4.4 Sıçanların koşu bandı üzerinde kaldıkları süre boyunca kat ettikleri mesafe değişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ 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 daha az süre koşu bandı üzerinde kalabildikleri ve daha kısa mesafe (% 38,63 daha az) kat edebildikleri görüldü. STZ indüklenmesiyle birlikte oluşan performans kaybı ve kaslardaki çabuk yorgunluğun, P antioksidan uygulamasıyla DM grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$) gösterecek kadar iyileştiği bulundu (DM+P; % 28,51 ve DM+PMA+P; % 37,74). R ve PMA uygulamalarının DM grubuna göre anlamlı farklılık göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$). DM+PMA+P grubunun DM+R ve DM+PMA gruplarından, % 31,05 ve % 23,78 sırasıyla, daha fazla performans artırıcı etki yaptığı görüldü ($p>0,05$).



Şekil 4.5 Sıçanlarda yorgunluk görülünceye kadar geçen sürenin gruplara göre değişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

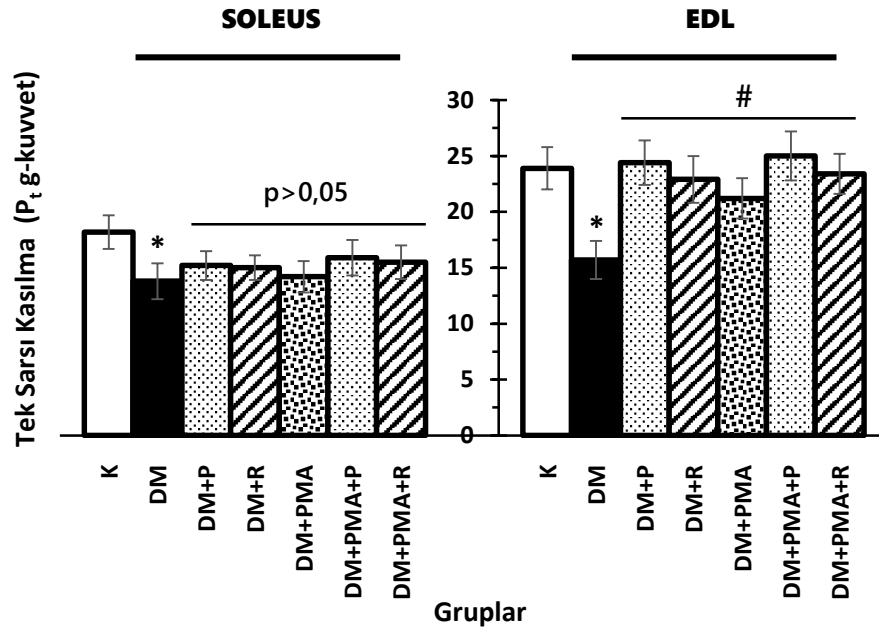
Sıçanlarda yorgunluk oluşuncaya kadar geçen süreler analiz edildiğinde, sadece DM+PMA+P grubunda DM grubuna göre anlamlı olarak yorgunluk süresinin uzadığı görüldü ($p<0,05$). Mesafe ve yorgunluk birlikte değerlendirildiğinde, P antioksidanının R'den anlamlılık düzeyinde ($p<0,05$) olmasa bile nispeten daha etkili olduğu görüldü.

DM grubuna göre diğer grupların; DM+PMA+P (% 28,27) > DM+P (% 21,20) > DM+PMA+R (% 13,09) > DM+PMA (% 10,50) > DM+R (% 5,42) sıralamasıyla etkili olduğu görüldü.

4.4 Biyomekanik Kayıtlamalar

4.4.1 İzometrik Tek Sarsı Kasılma Kuvvetleri ve Kasılma Parametreleri

Sıçanların soleus ve EDL kasları çıkarıldıktan sonra organ banyosu içerisinde tek sarsı kasılma yanıtları ve kasılma parametreleri kaydedildi. Kontrol grubundaki sıçanların EDL izometrik tek sarsı kasılma kuvvetleri soleus izometrik tek sarsı kasılma kuvvetlerinden büyük olmasına rağmen; K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus kaslarında % 24,18 ($p<0,05$), EDL kaslarında % 34,31 kuvvet azalması olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.6 Soleus ve EDL kaslarındaki Tek Sarsı (P_t) kasılma kuvvetlerinin gruplara göre değişimi.

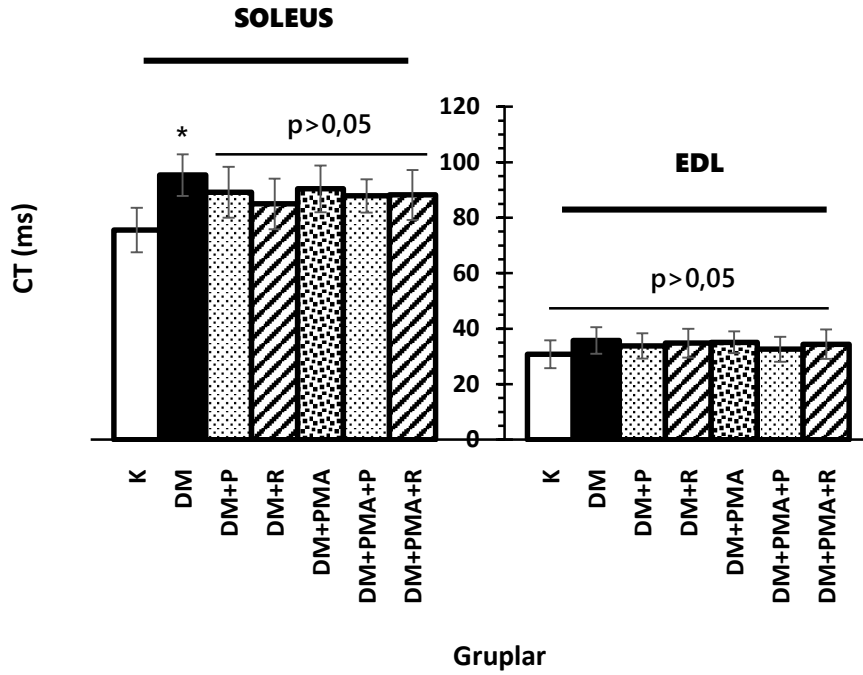
Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Antioksidan ve PMA uygulamalarının DM grubuna göre izometrik kasılma kuvvetlerini hangi oranlarda artırdığına bakıldığında:

Soleus kasları için; DM+PMA+P (% 15,22) > DM+PMA+R (% 12,32) > DM+P (% 10,12) > DM+R (% 8,70) > DM+PMA (% 2,90) olarak bulundu.

EDL kasları için; DM+PMA+P (% 59,42) > DM+P (% 55,41) > DM+PMA+R (% 49,04) > DM+R (% 45,86) > DM+PMA (% 35,03) olarak bulundu.

EDL kaslarında STZ indüklenmesiyle K'ya göre daha fazla kuvvet kaybı gözlenirken, kuvvet geri kazanımı soleus kaslarına göre daha fazla olmuştur.

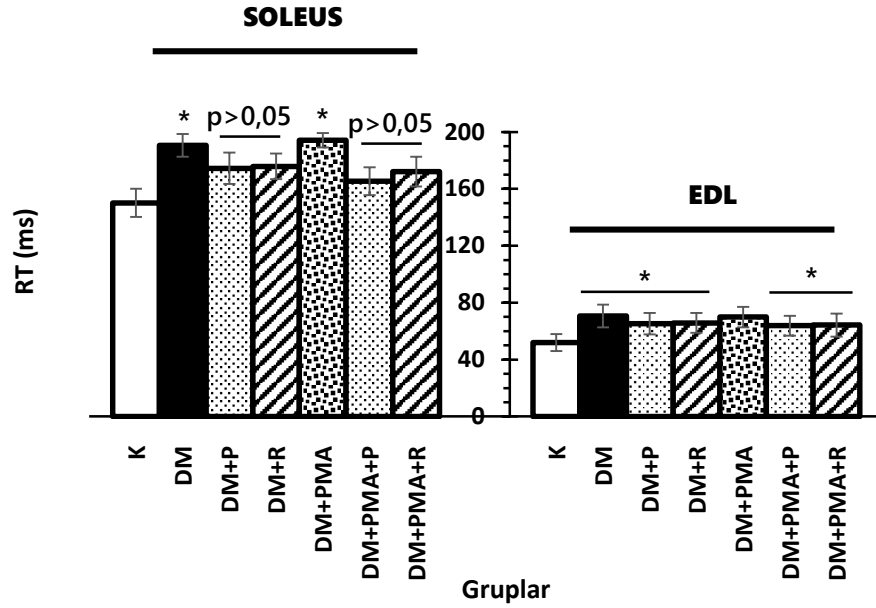


Şekil 4.7 Soleus ve EDL kaslarına ait kasılma sürelerindeki değişimler. CT, kasılmanın tepe noktasına kadar olan süreyi göstermektedir. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Kontrol grubuna göre Diyabetik sıçanların soleus ve EDL kaslarında kasılma sürelerinin sırasıyla % 26,19 ve % 16,23 oranında uzadığı görüldü. Diyabetle birlikte uzayan kasılma süresi yanıtlarının uygulanan yöntemlerle DM grubuna göre hangi oranlarda azaldığı:

Soleus kasları için; DM+R (% 10,90) > DM+PMA+P (% 7,86) > DM+PMA+R (% 7,55) > DM+P (% 6,50) > DM+PMA (% 5,24) olarak bulundu.

EDL kasları için; DM+R (% 8,94) > DM+P (% 5,59) > DM+PMA+R (% 3,91) > DM+R (% 2,79) > DM+PMA (% 1,96) olarak bulundu.



Şekil 4.8 Soleus ve EDL kaslarına ait gevşeme sürelerindeki değişimler. RT, kasılmanın tepe noktasından bitimine kadar olan süreyi göstermektedir. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

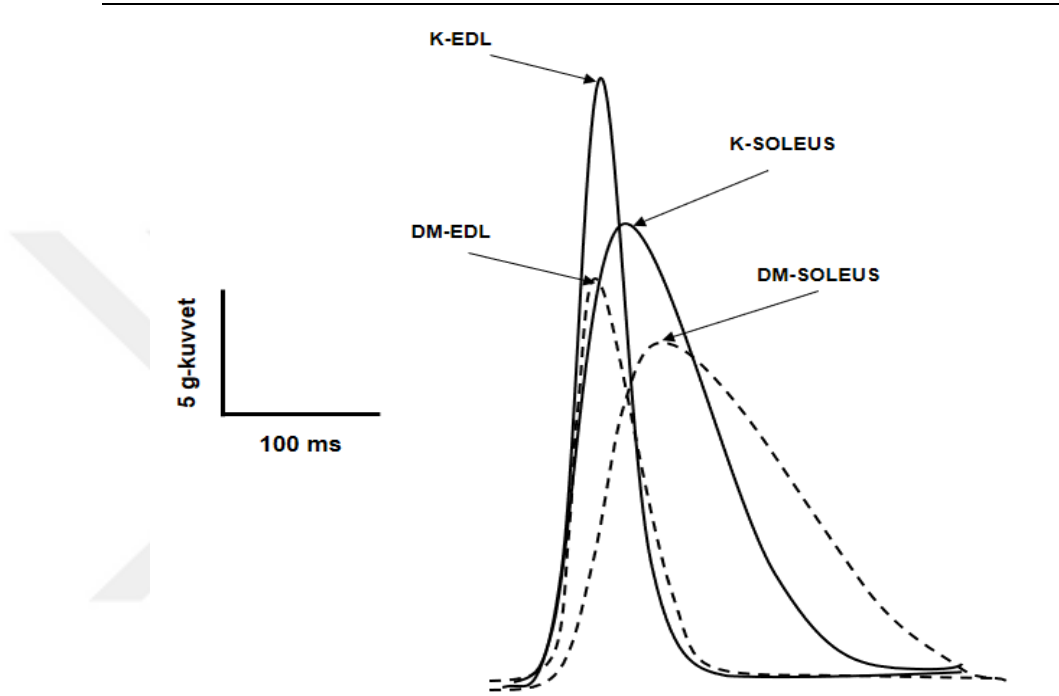
Kontrol grubuna göre Diyabetik sıçanların soleus ve EDL kaslarından kayıtlanan gevşeme sürelerinin sırasıyla % 26,90 ve % 35,77 oranında uzadığı görüldü. Diyabetle birlikte uzayan gevşeme süresi yanıtlarının uygulanan yöntemlerle DM grubuna göre hangi oranlarda azaldığı:

Soleus kasları için; DM+PMA+P (% 13,22) > DM+PMA+R (% 9,71) > DM+P (% 8,45) > DM+R (% 7,76) > DM+PMA (% 1,89) olarak bulundu.

EDL kasları için; DM+PMA+P (% 9,63) > DM+PMA+R (% 8,92) > DM+P (% 7,65) > DM+R (% 6,80) > DM+PMA (% 0,99) olarak bulundu.

Kasılma sürelerini iyileştirmede her iki kas grubu için, daha çok R ve PMA+P uygulamaları etkiliyken, gevşeme sürelerini iyileştirmede P ve PMA+R'nin daha etkili olduğu görüldü. Kasılmaya etki eden protein analizleri ile durum daha ayrıntılı incelendi.

Şekil 4.9, Soleus ve EDL kaslarına ait izometrik tek sarsı kasılma yanıtlarının ve toplam kasılma sürelerinin birebir ölçekli olarak görsel ifadesini temsil etmektedir. DM-EDL kasılma kuvveti DM-Soleus'tan daha büyük olduğu görülse de K grubuna göre yüzdesel olarak en fazla DM-EDL'de kuvvet düşüşü gözlemlendi.

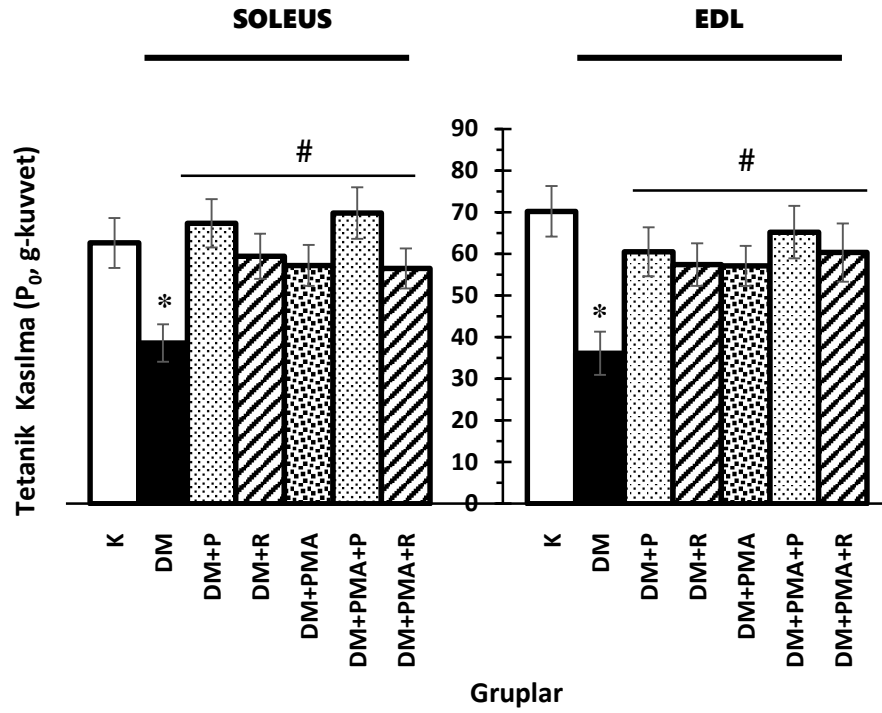


Şekil 4.9 K ve DM gruplarındaki soleus ve EDL kaslarına ait izometrik tek sarsı kasılma kuvvetleri.

K-Soleus, kontrol grubu soleus kası; K-EDL, kontrol grubu EDL kası; DM-Soleus, DM grubu soleus kası; DM-EDL, DM grubu EDL kasına ait izometrik kasılma kuvvetleri.

4.4.2 Tetanik Kasılma Kuvvetleri ve Değişik Frekanslarda Kasılmalar

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



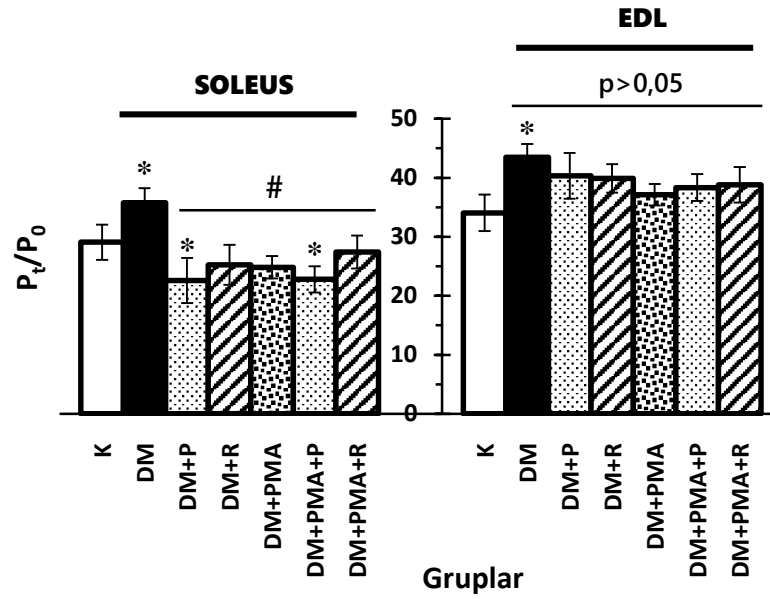
Şekil 4.10 Soleus ve EDL kaslarındaki Tetanik kasılma (P_0) kuvvetlerinin gruplara göre değişimi. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Kontrol grubuna göre DM grubundaki soleus ve EDL kaslarında tetanik kasılma kuvvetlerinin sırasıyla % 38,43 ve % 48,58 oranında azaldığı gözlemlendi.

Antioksidan ve PMA uygulamalarının DM grubuna göre tetanik kasılma kuvvetlerini hangi oranlarda artırdığına bakıldığında:

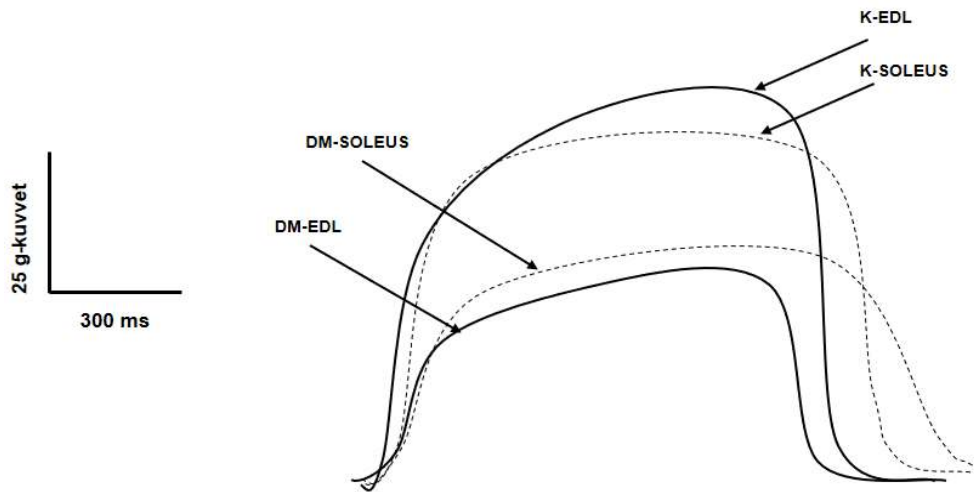
Soleus kasları için; DM+PMA+P (% 80,83) > DM+P (% 74,35) > DM+R (% 53,80) > DM+PMA (% 48,19) > DM+PMA+R (% 46,37) olarak bulundu.

EDL kasları için; DM+PMA+P (% 80,61) > DM+P (% 67,59) > DM+PMA+R (% 67,04) > DM+R (% 59,00) > DM+PMA (% 58,17) olarak bulundu.



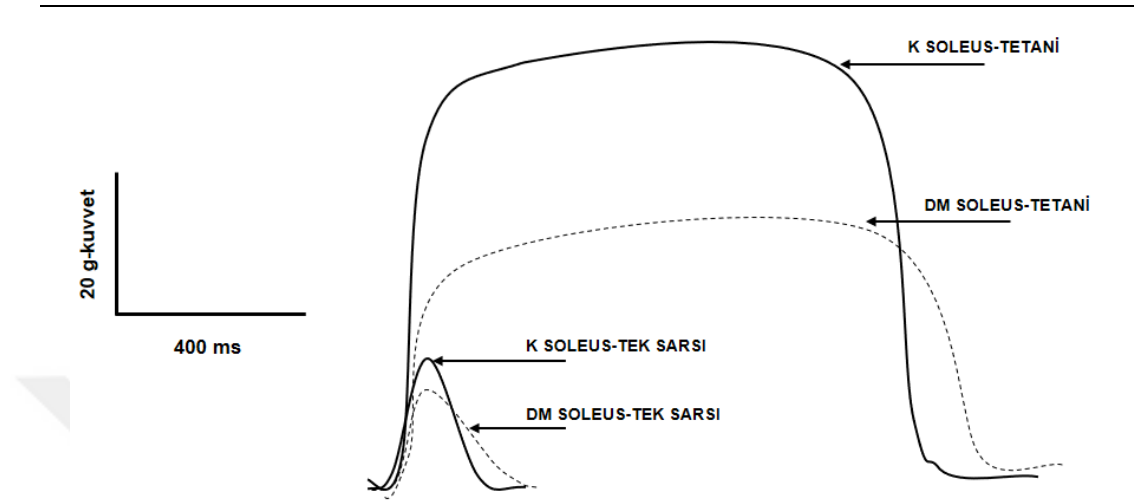
Şekil 4.11 Soleus ve EDL kaslarındaki P_t/P_0 kuvvet oranlarının gruplara göre değişimi. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Soleus ve EDL kaslarından kayıtlanan tek sarsı ve tetanik kasılma yanıtlarının oranına bakıldığında (P_t/P_0); uygulanan yöntemlerin EDL kaslarında DM grubuna göre anlamlı bir farklılık yapmadığı ($p > 0,05$), soleus kaslarında ise DM grubundan anlamlı olarak farklı bulunduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

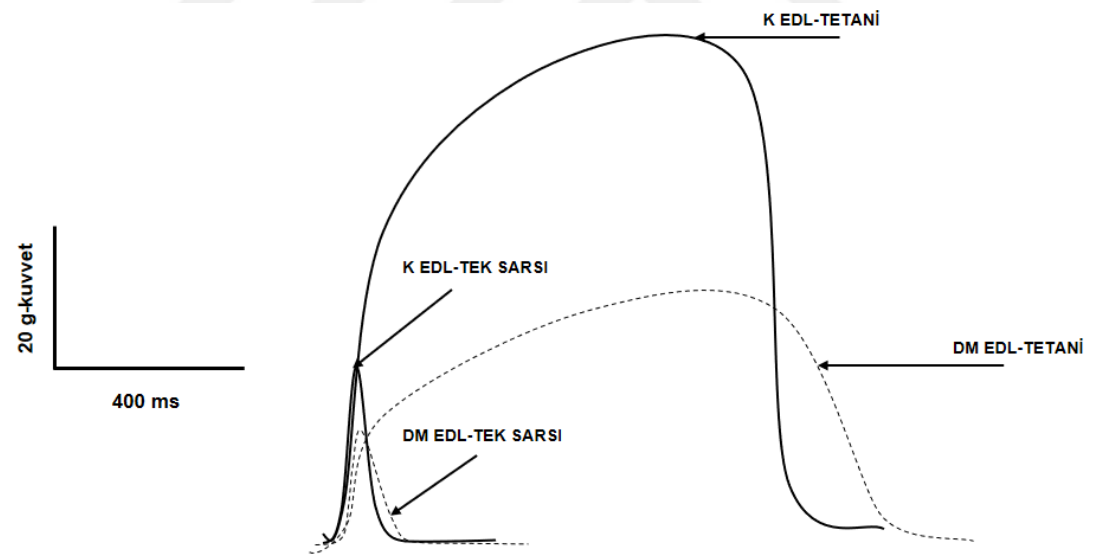


Şekil 4.12 Soleus ve EDL kaslarına ait tetanik kasılma kuvvetleri. K-EDL, kontrol grubu EDL kası; K-Soleus, kontrol grubu soleus kası; DM-EDL, DM grubu EDL kası; DM-Soleus, DM grubu soleus kasını ifade etmektedir.

Şekil 4.12 Tetanik kasılma kuvvetleri ve kasılma sürelerindeki değişimi birebir ölçekli olarak göstermektedir. Her iki kas grubunda da diyabetik sıçanların toplam kasılma sürelerinin uzadığı görülmektedir.



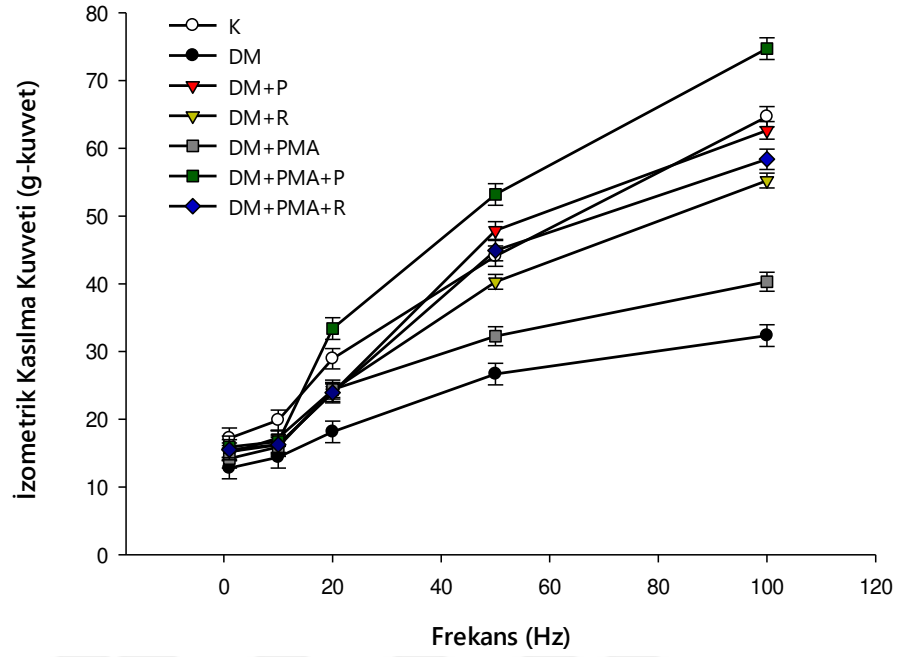
Şekil 4.13 Soleus kaslarına ait izometrik tek sarsı ve tetanik kasılma kuvvetlerinin gösterimi.



Şekil 4.14 EDL kaslarına ait izometrik tek sarsı ve tetanik kasılma kuvvetlerinin gösterimi.

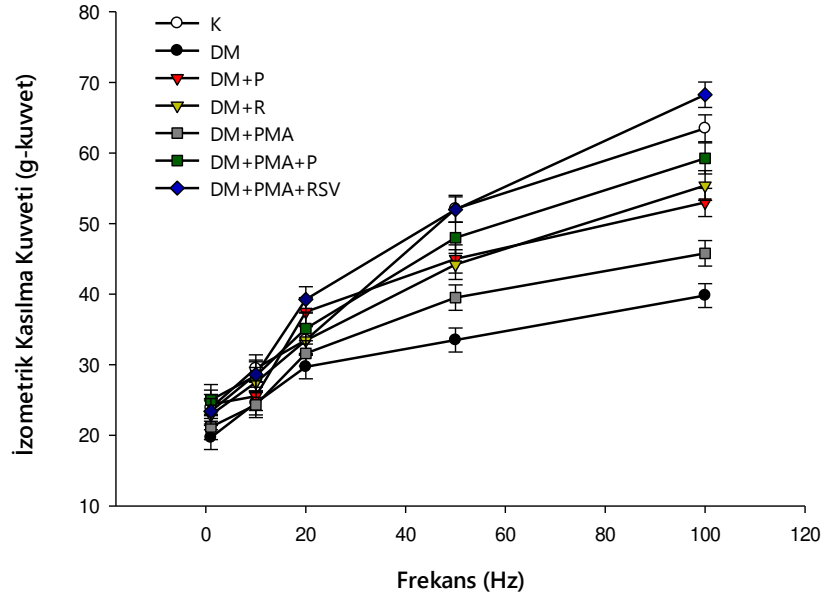
Şekil 4.13 ve 4.14 soleus ve EDL kaslarına ait tetanik ve tek sarsı kasıl kuvvetlerinin birebir ölçekli olarak karşılaştırmasını göstermektedir.

SOLEUS



Şekil 4.15 Soleus kası için değişen frekanslarda izometrik kasılma kuvveti yanıtları.

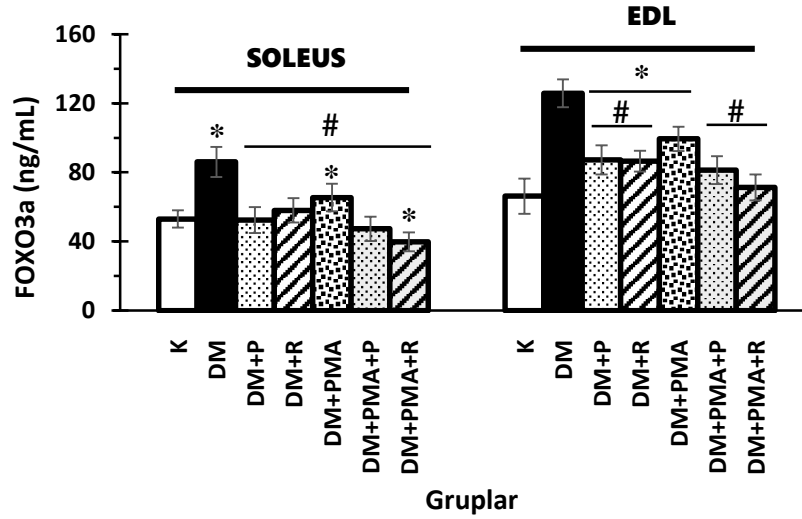
EDL



Şekil 4.16 EDL kasları için değişen frekanslarda izometrik kasılma kuvveti yanıtları.

4.5 ELİZA Protein Derişimleri

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında FOXO3a protein derişimlerinin sırasıyla % 62,50 ve % 90,00 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla FOXO3a derişim azalmasının DM+PMA+R grubunda olduğu görüldü, sırasıyla % 53,85 ve % 43,39.

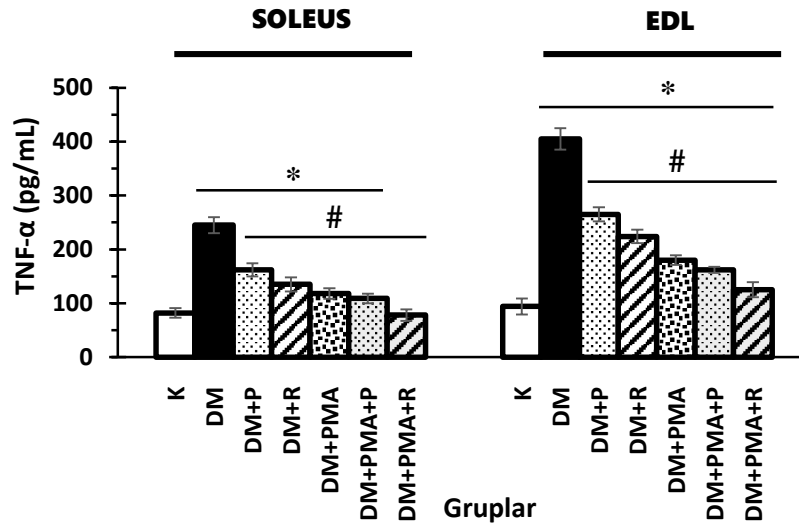


Şekil 4.17 Soleus ve EDL kaslarındaki FOXO3a protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3 Soleus ve EDL kaslarında FOXO3a derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0086	p=0,9453	p=0,6749	p=0,0477	p=0,4751	p=0,0436
DM			p=0,0196	p=0,0276	p=0,0463	p=0,0095	p=0,0100
DM+P				p=0,4237	p=0,0357	p=0,7222	p=0,0402
DM+R					p=0,4080	p=0,2831	p=0,0203
DM+PMA						p=0,0328	p=0,0127
DM+PMA+P							p=0,1365
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0014	p=0,0233	p=0,0267	p=0,0092	p=0,0806	p=0,7584
DM			p=0,0248	p=0,0230	p=0,0881	p=0,0149	p=0,0094
DM+P				p=0,8931	p=0,3832	p=0,5283	p=0,2042
DM+R					p=0,4667	p=0,6354	p=0,1657
DM+PMA						p=0,1876	p=0,0362
DM+PMA+P							p=0,3370
DM+PMA+R							



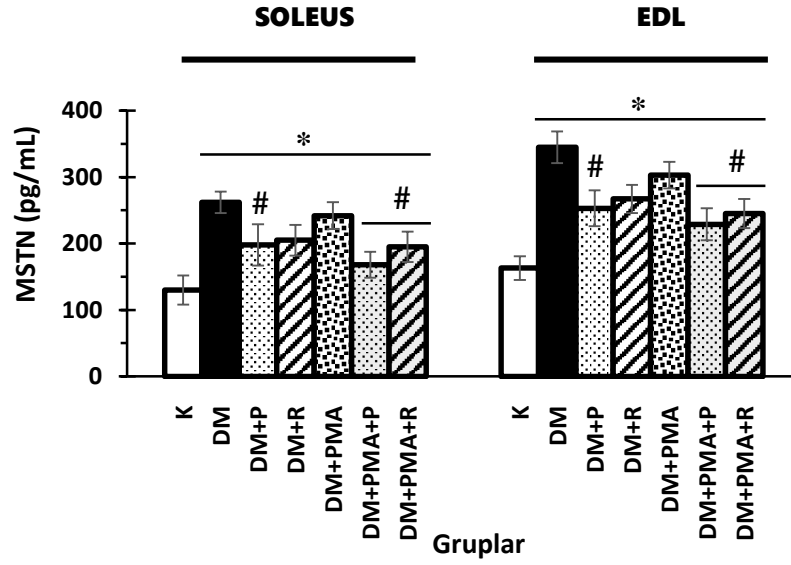
Şekil 4.18 Soleus ve EDL kaslarındaki TNF-α protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır (p<0,05), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır (p<0,05).

Çizelge 4.4 Soleus ve EDL kaslarında TNF-α derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0009	p=0,0009	p=0,0050	p=0,0126	p=0,0264	p=0,8094
DM			p=0,0228	p=0,0091	p=0,0099	p=0,0098	p=0,0037
DM+P				p=0,1915	p=0,0271	p=0,0296	p=0,0100
DM+R					p=0,1505	p=0,1299	p=0,0091
DM+PMA						p=0,8205	p=0,0247
DM+PMA+P							p=0,0369
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0004	p=0,0010	p=0,0003	p=0,0002	p=0,0067	p=0,0283
DM			p=0,0234	p=0,0094	p=0,0100	p=0,0090	p=0,0071
DM+P				p=0,1324	p=0,0210	p=0,0192	p=0,0095
DM+R					p=0,2563	p=0,0381	p=0,0097
DM+PMA						p=0,6919	p=0,0255
DM+PMA+P							p=0,0761
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında TNF-α protein derişimlerinin sırasıyla % 198,78 ve % 330,85 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla TNF-α derişim azalmasının DM+PMA+R grubunda olduğu, sırasıyla % 68,16 ve % 69,11 görüldü.



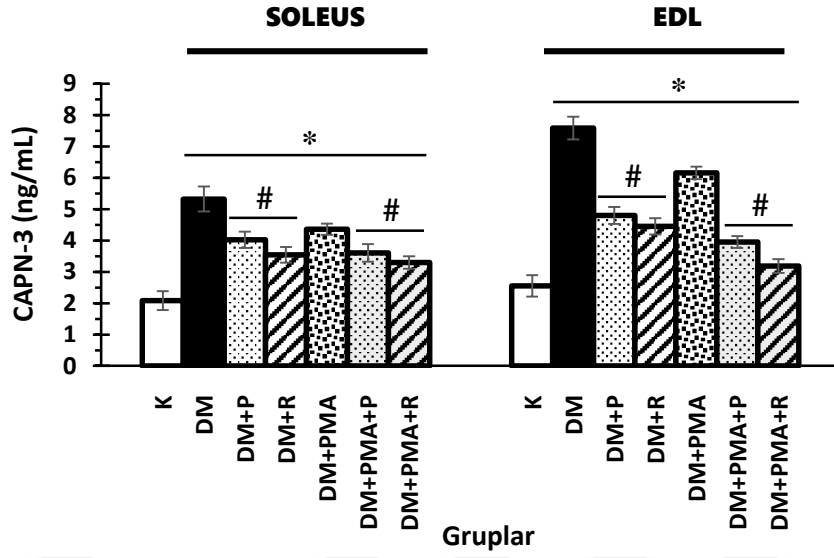
Şekil 4.19 Soleus ve EDL kaslarındaki MSTN protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.5 Soleus ve EDL kaslarında MSTN derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0003$	$p=0,0097$	$p=0,0098$	$p=0,0016$	$p=0,0328$	$p=0,0097$
DM			$p=0,0418$	$p=0,0780$	$p=0,6675$	$p=0,0129$	$p=0,0354$
DM+P				$p=0,8783$	$p=0,0575$	$p=0,1713$	$p=0,8911$
DM+R					$p=0,2489$	$p=0,1564$	$p=0,9410$
DM+PMA						$p=0,0217$	$p=0,2621$
DM+PMA+P							$p=0,1112$
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0008$	$p=0,0093$	$p=0,0046$	$p=0,0012$	$p=0,0093$	$p=0,0097$
DM			$p=0,0369$	$p=0,0934$	$p=0,3975$	$p=0,0240$	$p=0,0306$
DM+P				$p=0,7724$	$p=0,1587$	$p=0,7807$	$p=0,8987$
DM+R					$p=0,4044$	$p=0,3862$	$p=0,6271$
DM+PMA						$p=0,0485$	$p=0,1504$
DM+PMA+P							$p=0,6526$
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında MSTN protein derişimlerinin sırasıyla % 101,54 ve % 111,66 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla MSTN derişim azalmasının DM+PMA+P grubunda olduğu, sırasıyla % 35,88 ve % 33,62 görüldü.



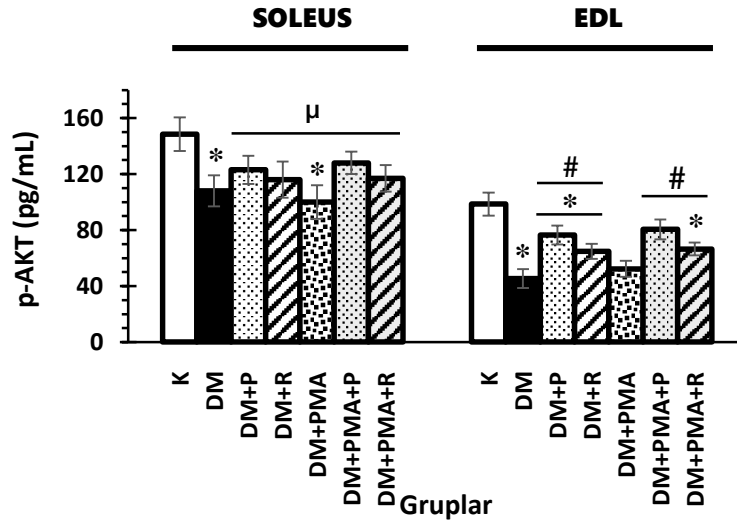
Şekil 4.20 Soleus ve EDL kaslarındaki CAPN-3 protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.6 Soleus ve EDL kaslarında CAPN-3 derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0004$	$p=0,0002$	$p=0,0087$	$p=0,0006$	$p=0,0029$	$p=0,0096$
DM			$p=0,0438$	$p=0,0203$	$p=0,1922$	$p=0,0254$	$p=0,0181$
DM+P				$p=0,4499$	$p=0,5696$	$p=0,4150$	$p=0,2428$
DM+R					$p=0,0461$	$p=0,8900$	$p=0,5745$
DM+PMA						0,1966	$p=0,0492$
DM+PMA+P							$p=0,7623$
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0009$	$p=0,0018$	$p=0,0074$	$p=0,0004$	$p=0,0099$	$p=0,0477$
DM			$p=0,0146$	$p=0,0098$	$p=0,2213$	$p=0,0096$	$p=0,0091$
DM+P				$p=0,6347$	$p=0,0309$	$p=0,1755$	$p=0,0264$
DM+R					$p=0,0193$	$p=0,4626$	$p=0,0354$
DM+PMA						$p=0,0167$	$p=0,0091$
DM+PMA+P							$p=0,1476$
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında CAPN-3 protein derişimlerinin sırasıyla % 155,77 ve % 197,25 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla CAPN-3 derişim azalmasının DM+PMA+R grubunda olduğu, sırasıyla % 37,97 ve % 58,01 görüldü.



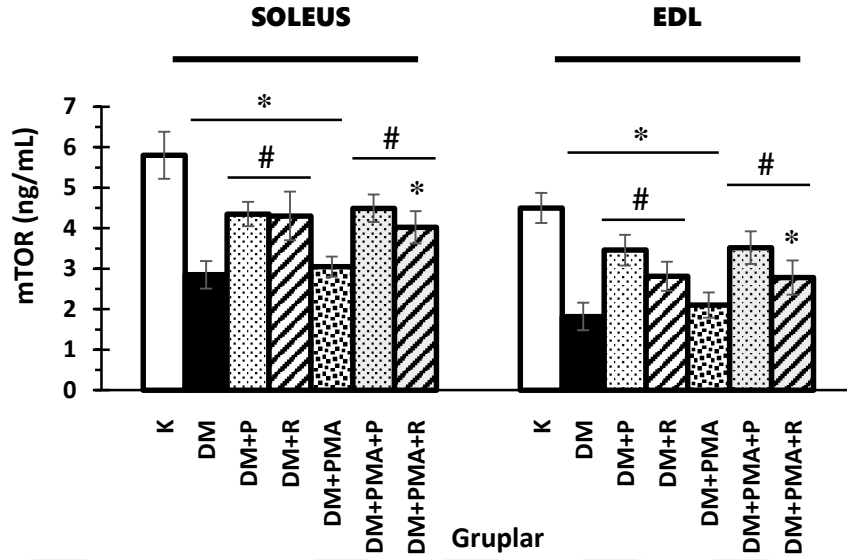
Şekil 4.21 Soleus ve EDL kaslarındaki p-AKT protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), μ DM grubundan anlamlı olarak farklı değildir ($p > 0,05$).

Çizelge 4.7 Soleus ve EDL kaslarında p-AKT derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0096	p=0,1755	p=0,0897	p=0,0362	p=0,3393	p=0,0934
DM			p=0,1577	p=0,7719	p=0,8323	p=0,2554	p=0,4397
DM+P				p=0,5433	p=0,4785	p=0,5117	p=0,6444
DM+R					p=0,6165	p=0,4416	p=0,8759
DM+PMA						p=0,0313	p=0,7244
DM+PMA+P							p=0,3722
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0087	p=0,0583	p=0,0182	p=0,0096	p=0,3846	p=0,0131
DM			p=0,0013	p=0,0095	0,2882	p=0,0010	p=0,0091
DM+P				p=0,2861	p=0,0121	p=0,3977	p=0,1345
DM+R					p=0,2581	p=0,0113	p=0,8393
DM+PMA						p=0,0019	p=0,0268
DM+PMA+P							p=0,2520
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında p-AKT protein derişimlerinin sırasıyla % 27,22 ve % 53,93 oranında azaldığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla p-AKT derişim artışının DM+PMA+P grubunda olduğu, sırasıyla % 18,52 ve % 77,23 görüldü.



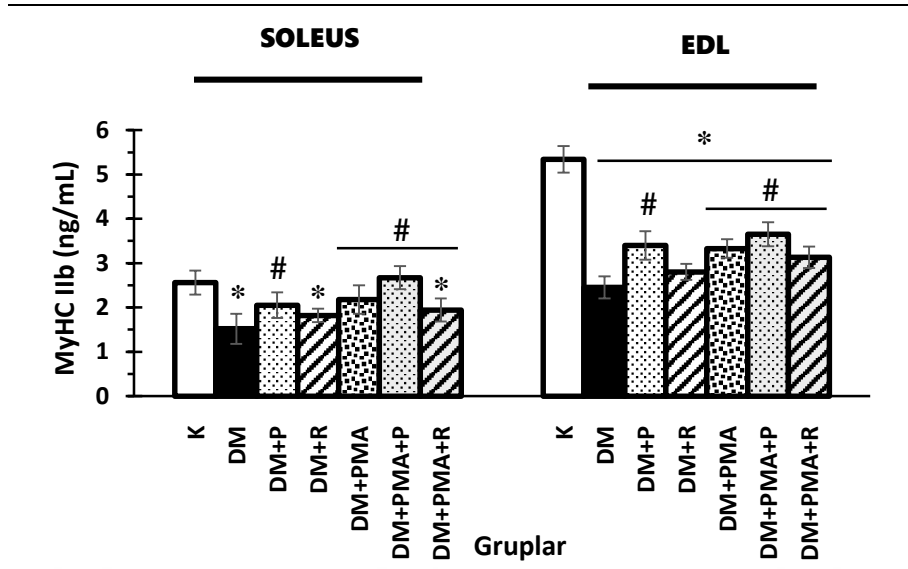
Şekil 4.22 Soleus ve EDL kaslarındaki mTOR protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.8 Soleus ve EDL kaslarında mTOR derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0097$	$p=0,0445$	$p=0,0354$	$p=0,0100$	$p=0,0578$	$p=0,0214$
DM			$p=0,0099$	$p=0,0099$	$p=0,7543$	$p=0,0093$	$p=0,0093$
DM+P				$p=0,8639$	$p=0,0365$	$p=0,9327$	$p=0,5071$
DM+R					$p=0,0362$	$p=0,9657$	$p=0,5939$
DM+PMA						$p=0,0093$	$p=0,0290$
DM+PMA+P							$p=0,3290$
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0100$	$p=0,0407$	$p=0,0124$	$p=0,0096$	$p=0,0924$	$p=0,0184$
DM			$p=0,0002$	$p=0,0097$	$p=0,2032$	$p=0,0010$	$p=0,0090$
DM+P				$p=0,2623$	$p=0,0134$	$p=0,9117$	$p=0,1574$
DM+R					$p=0,0308$	$p=0,0349$	$p=0,8419$
DM+PMA						$p=0,0071$	$p=0,0243$
DM+PMA+P							$p=0,0573$
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında mTOR protein derişimlerinin sırasıyla % 50,86 ve % 59,56 oranında azaldığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla mTOR derişim artışının DM+PMA+P grubunda olduğu, sırasıyla % 57,54 ve % 93,41 görüldü.



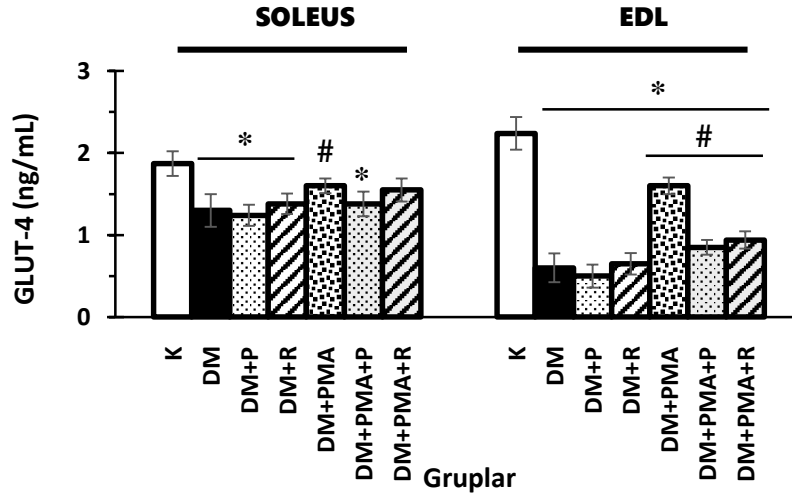
Şekil 4.23 Soleus ve EDL kaslarındaki MyHC IIb protein derişimleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.9 Soleus ve EDL kaslarında MyHC IIb derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0100	p=0,2259	p=0,0301	p=0,3335	p=0,8180	p=0,0478
DM			p=0,0273	p=0,2419	p=0,0096	p=0,0047	p=0,0347
DM+P				p=0,3974	p=0,6832	p=0,0229	p=0,6021
DM+R					p=0,1319	p=0,0094	p=0,7152
DM+PMA						p=0,0724	p=0,3955
DM+PMA+P							p=0,0306
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0095	p=0,0165	p=0,0094	p=0,0127	p=0,0274	p=0,0090
DM			p=0,0135	p=0,3485	p=0,0110	p=0,0093	p=0,0306
DM+P				p=0,2357	p=0,8395	p=0,6594	p=0,5852
DM+R					p=0,1970	p=0,0229	p=0,3420
DM+PMA						p=0,7368	p=0,5074
DM+PMA+P							p=0,4464
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında MyHC IIb protein derişimlerinin sırasıyla % 40,63 ve % 54,12 oranında azaldığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla MyHC IIb derişim artışının DM+PMA+P grubunda olduğu, sırasıyla % 75,66 ve % 48,98 görüldü.



Şekil 4.24 Soleus ve EDL kaslarındaki GLUT-4 protein derişimleri
Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. * K grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$), # DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.10 Soleus ve EDL kaslarında GLUT-4 derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

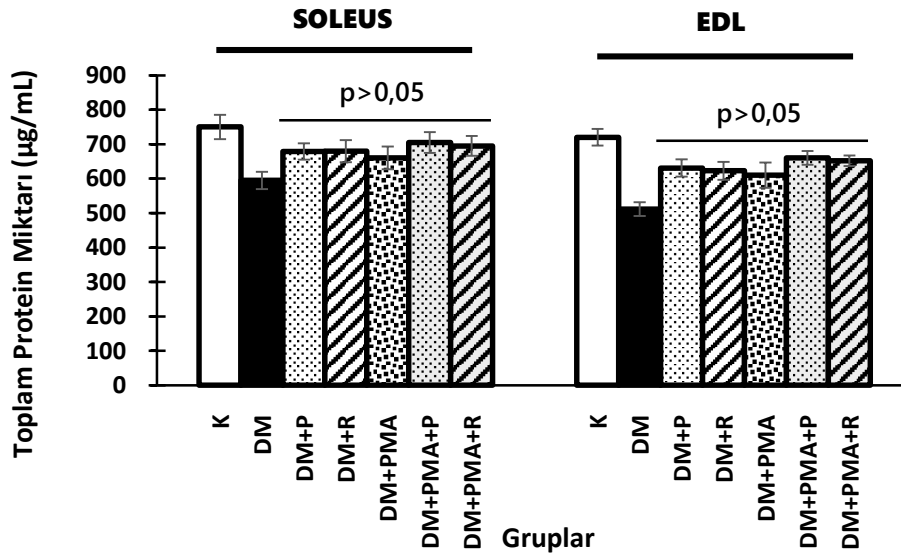
SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0268$	$p=0,0278$	$p=0,0400$	0,3628	$p=0,0336$	0,2489
DM			$p=0,8262$	$p=0,5715$	$p=0,0499$	$p=0,5937$	$p=0,1463$
DM+P				$p=0,3069$	$p=0,0351$	$p=0,4590$	$p=0,0493$
DM+R					$p=0,2138$	$p=0,8704$	$p=0,3465$
DM+PMA						$p=0,3997$	$p=0,8387$
DM+PMA+P							$p=0,3712$
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0052$	$p=0,0059$	$p=0,0035$	$p=0,0350$	$p=0,0087$	$p=0,0090$
DM			$p=0,2353$	$p=0,7433$	$p=0,0002$	$p=0,0090$	$p=0,0100$
DM+P				$p=0,0393$	$p=0,0007$	$p=0,0057$	$p=0,0011$
DM+R					$p=0,0003$	$p=0,0247$	$p=0,0092$
DM+PMA						$p=0,0096$	$p=0,0100$
DM+PMA+P							$p=0,3197$
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında GLUT-4 protein derişimlerinin sırasıyla % 30,48 ve % 73,21 oranında azaldığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarına bağlı olarak DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla GLUT-4 derişim artışının DM+PMA grubunda olduğu, sırasıyla % 23,08 ve % 166,67 görüldü.

4.5.1 Bradford Toplam Protein Derişimleri

Toplam protein miktarının K grubuna göre DM grubunda % 20,67 (soleus) ve % 28,89 (EDL) oranında azaldığı bulundu. STZ indüklenmesiyle birlikte azalan toplam protein derişiminin DM grubuna göre PMA+P uygulamasıyla % 18,49 (soleus) ve % 28,91 (EDL) oranında arttığı görüldü.



Şekil 4.25 Soleus ve EDL kaslarındaki toplam protein derişimleri.

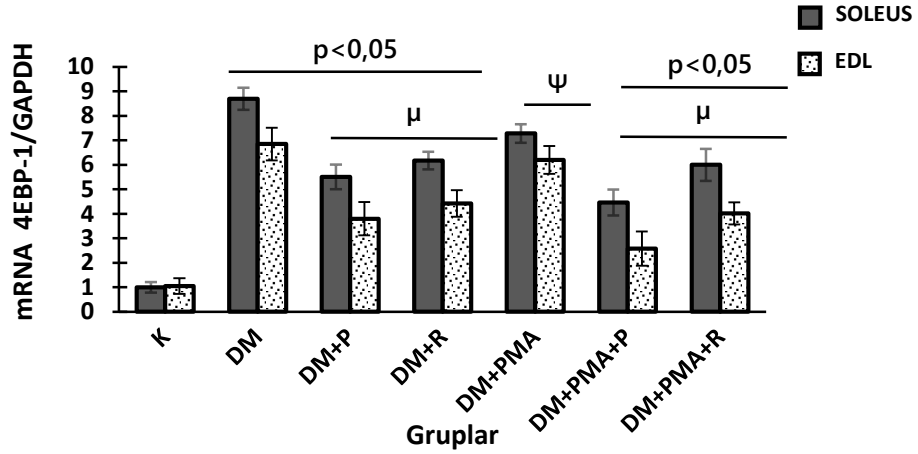
Çizelge 4.11 Soleus ve EDL kaslarında toplam protein derişimlerinin gruplara göre karşılaştırması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0404	p=0,6003	p=0,6969	p=0,3732	p=0,5828	p=0,5143
DM			p=0,3774	p=0,3006	p=0,4932	p=0,1322	p=0,2306
DM+P				p=0,8487	p=0,9603	p=0,8786	p=0,8656
DM+R					p=0,9678	p=0,9848	p=0,9505
DM+PMA						p=0,5251	p=0,6584
DM+PMA+P							p=0,9972
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0318	p=0,4135	p=0,3100	p=0,1855	p=0,7718	p=0,5997
DM			p=0,0423	p=0,0437	p=0,0448	p=0,0381	p=0,0327
DM+P				p=0,9586	p=0,9583	p=0,9457	p=0,9889
DM+R					p=0,9032	p=0,7482	p=0,8403
DM+PMA						p=0,6819	p=0,5478
DM+PMA+P							p=0,9150
DM+PMA+R							

4.6 Real Time qPCR Gen Ekspresyon Değerleri

4E-BP1, FOXO3a, MAFbx (FBXO32) ve MuRF-1 (TRIM63) gen ekspresyonları incelendi.



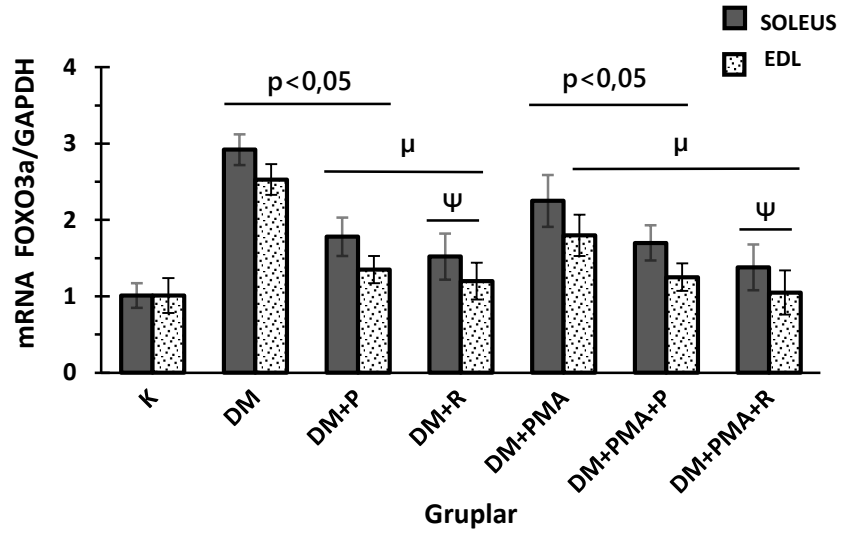
Şekil 4.26 Soleus ve EDL kaslarında 4E-BP1 gen ekspresyon katlı değişim değerleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. Ψ gruplar anlamlı olarak farklı değildir ($p>0,05$), μ DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Çizelge 4.12 Soleus ve EDL kaslarında 4E-BP1 gen ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0006$	$p=0,0006$	$p=0,0009$	$p=0,0005$	$p=0,0005$	$p=0,0006$
DM			$p=0,0142$	$p=0,0302$	$p=0,1008$	$p=0,0092$	$p=0,0249$
DM+P				$p=0,3117$	$p=0,0201$	$p=0,1258$	$p=0,6617$
DM+R					0,2966	$p=0,0315$	$p=0,9575$
DM+PMA						$p=0,0143$	$p=0,1538$
DM+PMA+P							$p=0,0237$
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0003$	$p=0,0001$	$p=0,0003$	$p=0,0003$	$p=0,0003$	$p=0,0008$
DM			$p=0,0090$	$p=0,0119$	$p=0,7171$	$p=0,0072$	$p=0,0097$
DM+P				$p=0,1318$	$p=0,0081$	$p=0,0223$	$p=0,6696$
DM+R					$p=0,0096$	$p=0,0091$	$p=0,5599$
DM+PMA						$p=0,0090$	$p=0,0119$
DM+PMA+P							$p=0,0097$
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında 4E-BP1 gen ekspresyon miktarlarının sırasıyla % 770,10 ve % 552,38 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarında, DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla 4E-BP1 gen ekspresyon azalmasının DM+PMA+P grubunda olduğu, sırasıyla % 48,74 ve % 62,34 görüldü.



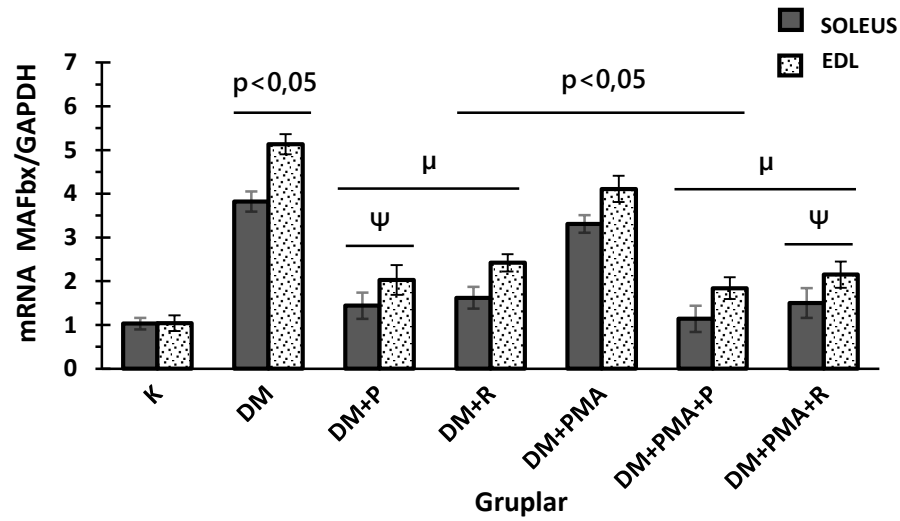
Şekil 4.27 Soleus ve EDL kaslarında FOXO3a gen ekspresyon katlı değişim değerleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. Ψ gruplar anlamlı olarak farklı değildir ($p>0,05$), μ DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Çizelge 4.13 Soleus ve EDL kaslarında FOXO3a gen ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0005$	$p=0,0026$	$p=0,0094$	$p=0,0004$	$p=0,0028$	$p=0,0104$
DM			$p=0,0169$	$p=0,0099$	$p=0,0743$	$p=0,0092$	$p=0,0094$
DM+P				$p=0,4822$	$p=0,0312$	$p=0,9626$	$p=0,0838$
DM+R					$p=0,0094$	$p=0,3278$	$p=0,5686$
DM+PMA						$p=0,0403$	$p=0,0172$
DM+PMA+P							$p=0,1507$
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		$p=0,0009$	$p=0,0227$	$p=0,2714$	$p=0,0044$	$p=0,0466$	$p=0,9681$
DM			$p=0,0100$	$p=0,0098$	$p=0,0312$	$p=0,0100$	$p=0,0094$
DM+P				$p=0,4562$	$p=0,0250$	$p=0,6273$	$p=0,0875$
DM+R					$p=0,0098$	$p=0,8582$	$p=0,3265$
DM+PMA						$p=0,0291$	$p=0,0098$
DM+PMA+P							$p=0,1861$
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında FOXO3a gen ekspresyon miktarlarının sırasıyla % 189,11 ve % 150,50 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarında, DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla FOXO3a gen ekspresyon azalmasının DM+PMA+R grubunda olduğu, sırasıyla % 52,68 ve % 58,50 görüldü.



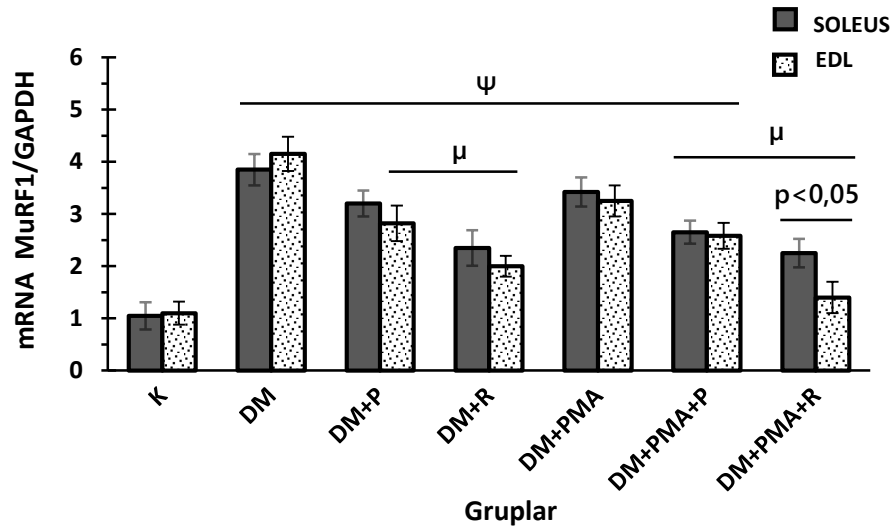
Şekil 4.28 Soleus ve EDL kaslarında MAFbx gen ekspresyon katlı değişim değerleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. Ψ gruplar anlamlı olarak farklı değildir ($p>0,05$), μ DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Çizelge 4.14 Soleus ve EDL kaslarında MAFbx gen ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.

SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0003	p=0,0187	p=0,0099	p=0,0007	p=0,4339	p=0,0091
DM			p=0,0046	p=0,0099	p=0,4227	p=0,0056	p=0,0086
DM+P				p=0,3288	p=0,0010	p=0,0612	p=0,8094
DM+R					p=0,0010	p=0,0314	p=0,6762
DM+PMA						p=0,0034	p=0,0094
DM+PMA+P							p=0,0228
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0010	p=0,0003	p=0,0006	p=0,0007	p=0,0025	p=0,0005
DM			p=0,0089	p=0,0097	p=0,1037	p=0,0074	p=0,0100
DM+P				p=0,1341	p=0,0009	p=0,5031	p=0,5238
DM+R					p=0,0071	p=0,0499	p=0,3332
DM+PMA						p=0,0100	p=0,0095
DM+PMA+P							p=0,1216
DM+PMA+R							

K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında MAFbx gen ekspresyon miktarlarının sırasıyla % 270,98 ve % 392,11 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarıyla, DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla MAFbx gen ekspresyon azalmasının DM+PMA+P grubunda olduğu, sırasıyla % 60,73 ve % 58,09 görüldü.



Şekil 4.29 Soleus ve EDL kaslarında MuRF-1 gen ekspresyon katlı değişim değerleri. Sonuçlar, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak verildi. Ψ gruplar anlamlı olarak farklı değildir ($p>0,05$), μ DM grubundan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Çizelge 4.15 Soleus ve EDL kaslarında MuRF-1 gen ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.

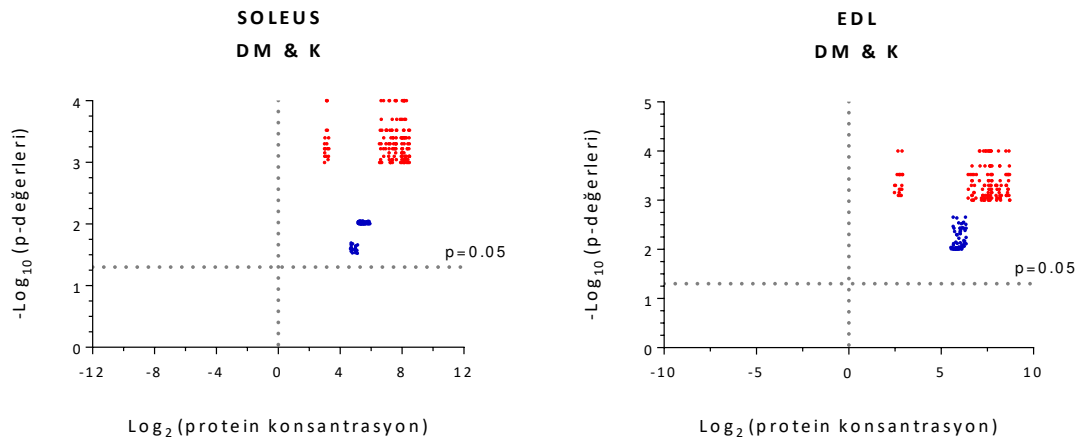
SOLEUS							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0005	p=0,0003	p=0,0010	p=0,0008	p=0,0004	p=0,0010
DM			p=0,1459	p=0,0119	p=0,4791	p=0,0248	p=0,0090
DM+P				p=0,0350	p=0,7623	p=0,2820	p=0,0374
DM+R					p=0,0094	p=0,4477	p=0,8165
DM+PMA						p=0,0416	p=0,0213
DM+PMA+P							p=0,3080
DM+PMA+R							

EDL							
GRUPLAR	K	DM	DM+P	DM+R	DM+PMA	DM+PMA+P	DM+PMA+R
K		p=0,0003	p=0,0002	p=0,0018	p=0,0002	p=0,0005	p=0,0327
DM			p=0,0277	p=0,0090	p=0,0862	p=0,0199	p=0,0044
DM+P				p=0,0339	p=0,2531	p=0,6376	p=0,0095
DM+R					p=0,0048	p=0,0357	p=0,0355
DM+PMA						p=0,0876	p=0,0096
DM+PMA+P							p=0,0096
DM+PMA+R							

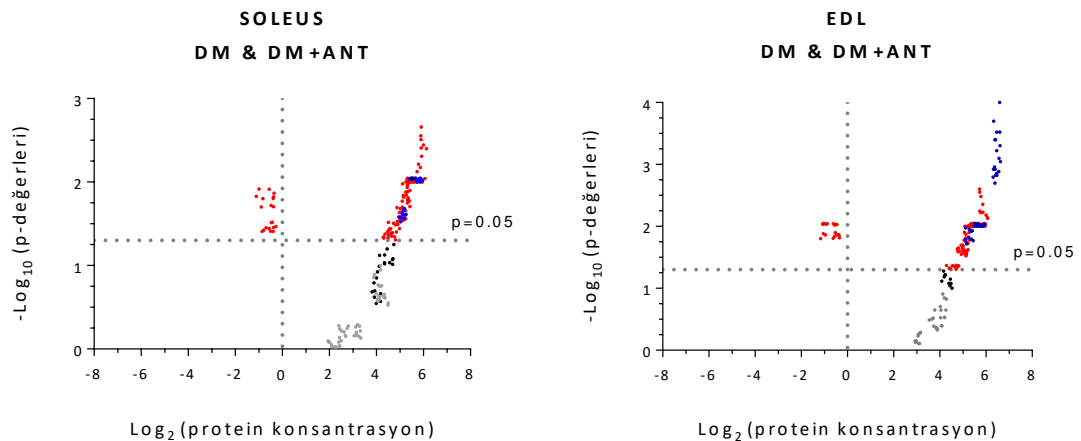
K grubuna göre DM grubundaki sıçanların soleus ve EDL kaslarında MuRF-1 gen ekspresyon miktarlarının sırasıyla % 266,85 ve % 204,92 oranında arttığı bulundu. Antioksidan ve PMA uygulamalarıyla, DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında en fazla MuRF-1 gen ekspresyon azalmasının DM+PMA+R grubunda olduğu, sırasıyla % 41,56 ve % 66,27 görüldü.

4.7 İstatiksel Dağılım p-Volkan Grafikleri

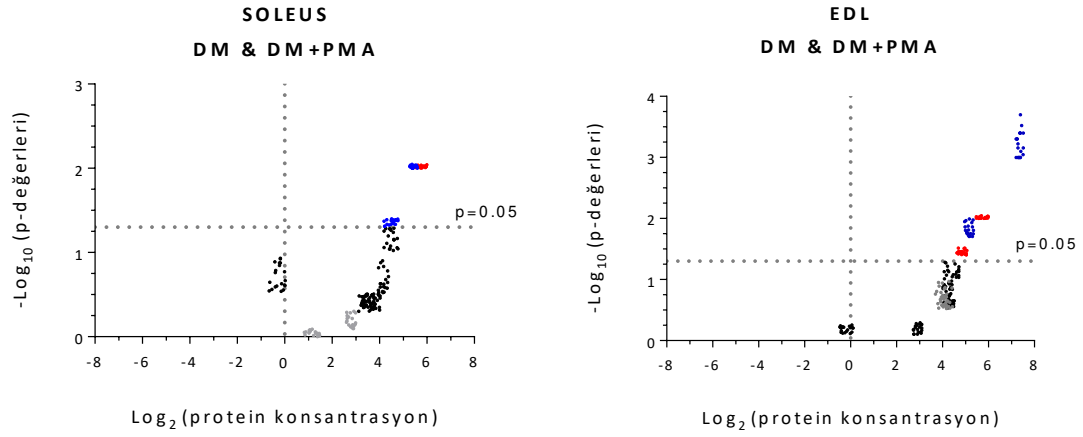
Anabolik ve katabolik yollarda atrofiyi yukarı regüle; 4E-BP1, FOXO3A, MAFbx, MuRF-1, TNF- α , CAPN3 ve MSTN ve aşağı regüle; p-AKT, GLUT-4, mTOR ve MyHC IIb eden proteinlerin değişimleri $-\log_{10}$ (p-değerleri) ve $\log_2$ (protein konsantrasyon) değerleri kullanılarak p-volkan grafikleri ile verildi. Çalışmada uygulanan yöntemlerin etki gücü, diyabetik sıçanlara P ve R antioksidanlarının uygulandığı gruplar (DM+ANT), PMA uygulanan gruplar (DM+PMA), PMA ve P-R antioksidanlarının uygulandığı (DM+PMA+ANT) gruplar şeklinde karşılaştırmalı olarak incelendi.



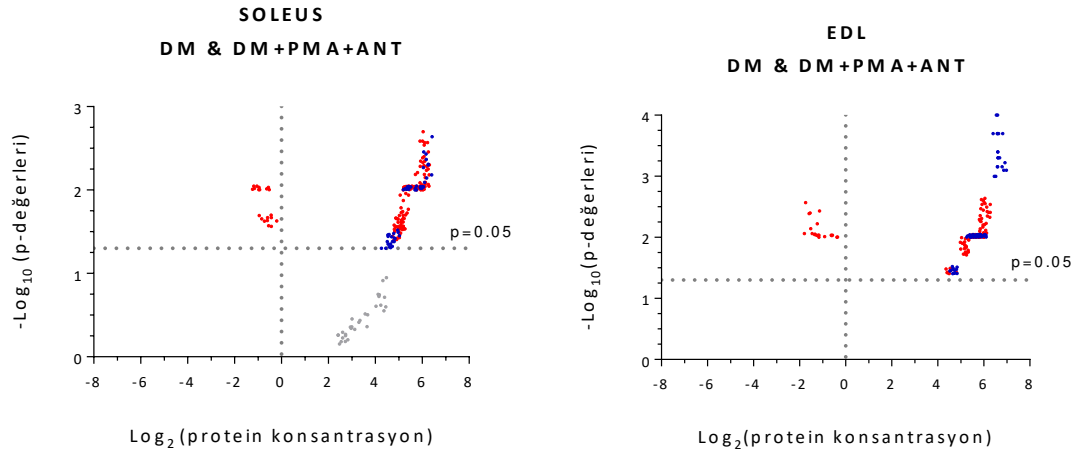
Şekil 4.30 DM ve K gruplarında soleus ve EDL kaslarına ait p-volkan protein dağılımı. $p=0,05$ çizgisinin üstü anlamlı ($p<0,05$) altı ise anlamsız ($p>0,05$) farklılıkları temsil etmektedir. Yukarı regüle (kırmızı) ve aşağı regüle (mavi) proteinlerdir.



Şekil 4.31 DM ve DM+ANT gruplarında soleus ve EDL kaslarına ait p-volkan dağılımı. $p=0,05$ çizgisinin üstü anlamlı ($p<0,05$) altı ise anlamsız ($p>0,05$) farklılıkları temsil etmektedir. Yukarı regüle anlamlı (kırmızı), yukarı regüle anlamsız (siyah), aşağı regüle anlamlı (mavi) ve aşağı regüle anlamsız (gri) proteinlerdir.

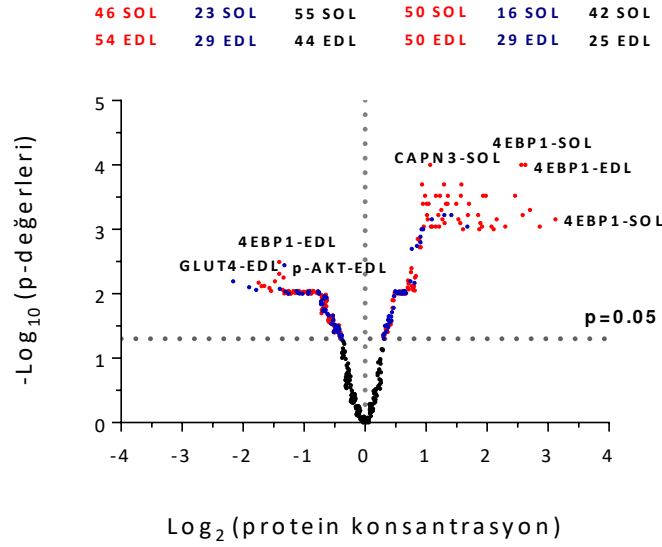


Şekil 4.32 DM ve DM+PMA gruplarında soleus ve EDL kaslarına ait p-volcan dağılımı. $p=0,05$ çizgisinin üstü anlamlı ($p<0,05$) altı ise anlamsız ($p>0,05$) farklılıkları temsil etmektedir. Yukarı regüle anlamlı (kırmızı), yukarı regüle anlamsız (siyah), aşağı regüle anlamlı (mavi) ve aşağı regüle anlamsız (gri) proteinlerdir.



Şekil 4.33 DM ve DM+PMA+ANT gruplarında soleus ve EDL kaslarına ait p-volcan dağılımı. $p=0,05$ çizgisinin üstü anlamlı ($p<0,05$) altı ise anlamsız ($p>0,05$) farklılıkları temsil etmektedir. Yukarı regüle anlamlı (kırmızı), yukarı regüle anlamsız (siyah), aşağı regüle anlamlı (mavi) ve aşağı regüle anlamsız (gri) proteinlerdir.

p volkan grafiği dağılımlarına göre, atrofiyi yukarı regüle eden ve aşağı regüle proteinlerin uygulanan yöntemlere göre dağılımına bakıldığında, DM+PMA+ANT uygulamasının diyabetle gelişen yukarı regülasyonu baskıladığı ve anlamlı olarak aşağı regülasyon proteinlerini aktive ettiği görülmektedir.



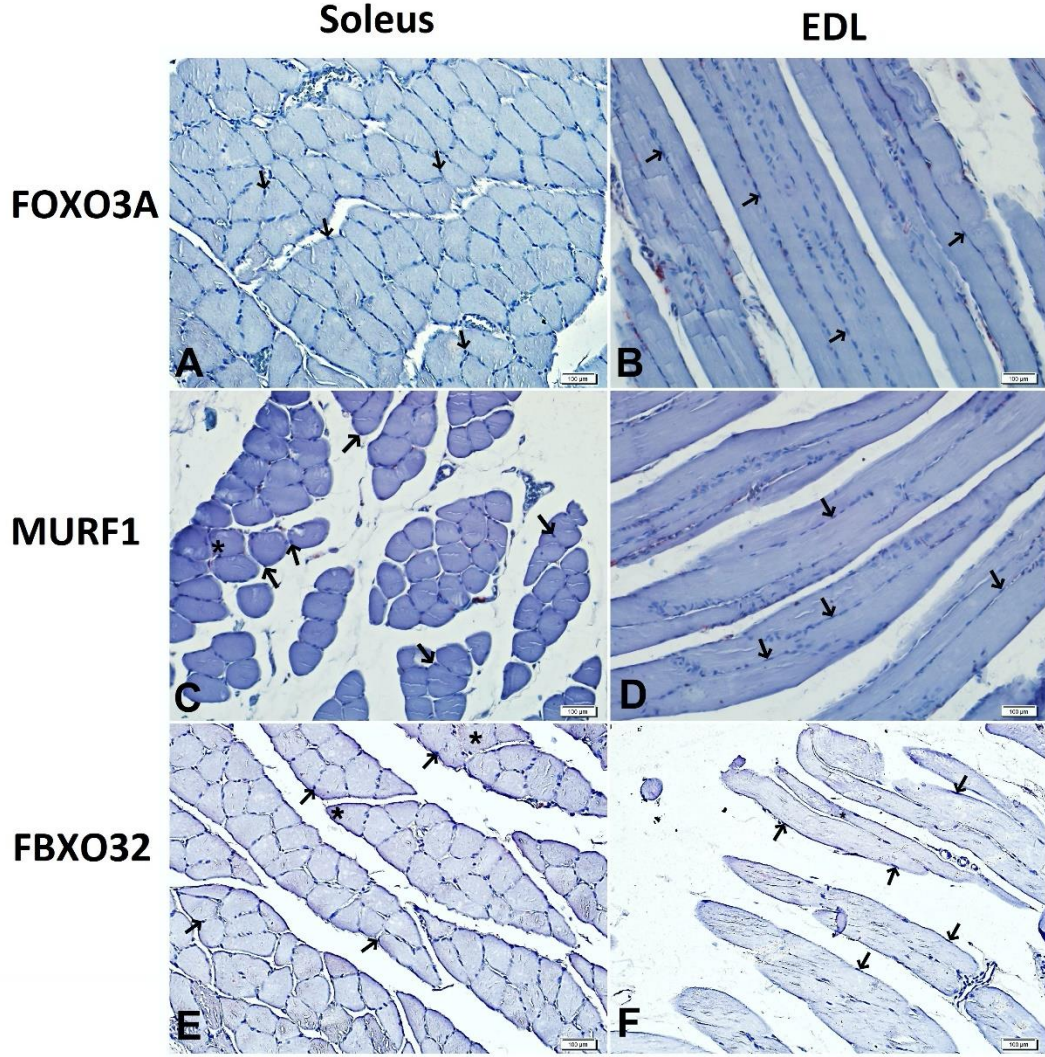
Şekil 4.34 DM ve diğer uygulama grupları arasındaki p-volkan dağılımı. $p=0,05$ çizgisinin üstü anlamlı ($p<0,05$) altı ise anlamsız ($p>0,05$) farklılıkları temsil etmektedir. Yukarı regüle anlamlı (kırmızı), aşağı regüle anlamlı (mavi) ve yukarı-aşağı regüle anlamsız (siyah) olarak ifade edildi. SOL; soleus ve EDL; Ekstensor Digitorum Longus

Şekil 4.34 soleus ve EDL kasları birlikte değerlendirildi, DM grubuna göre diğer uygulama gruplarının (Antioksidan, PMA ve PMA+Antioksidan) dağılımını ifade etmektedir. 4E-BP1 konsantrasyon değişimin en fazla anlamlılık düzeyine sahip olduğu görülmektedir. EDL kaslarındaki anlamlı düzeyde aşağı düzenleyici iyileştirme sayısının soleus'tan daha fazla olduğu dağılımdan görülmektedir. soleus ve EDL kasları için anlamlı düzeyde yukarı düzenleyici iyileştirme sayısının neredeyse eşit olduğu gözlemlendi.

4.8 İmmünohistokimya Görüntüleri

Diyabetik kas atrofisine aracılık eden işaretçilerin immünreaktivitesinin belirlenmesi amacıyla, tüm gruplardan elde edilen soleus ve EDL kas dokusu örneklerinde MuRF1, FBXO32 (MAFbx) ve FOXO3A ekspresyonları immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi.

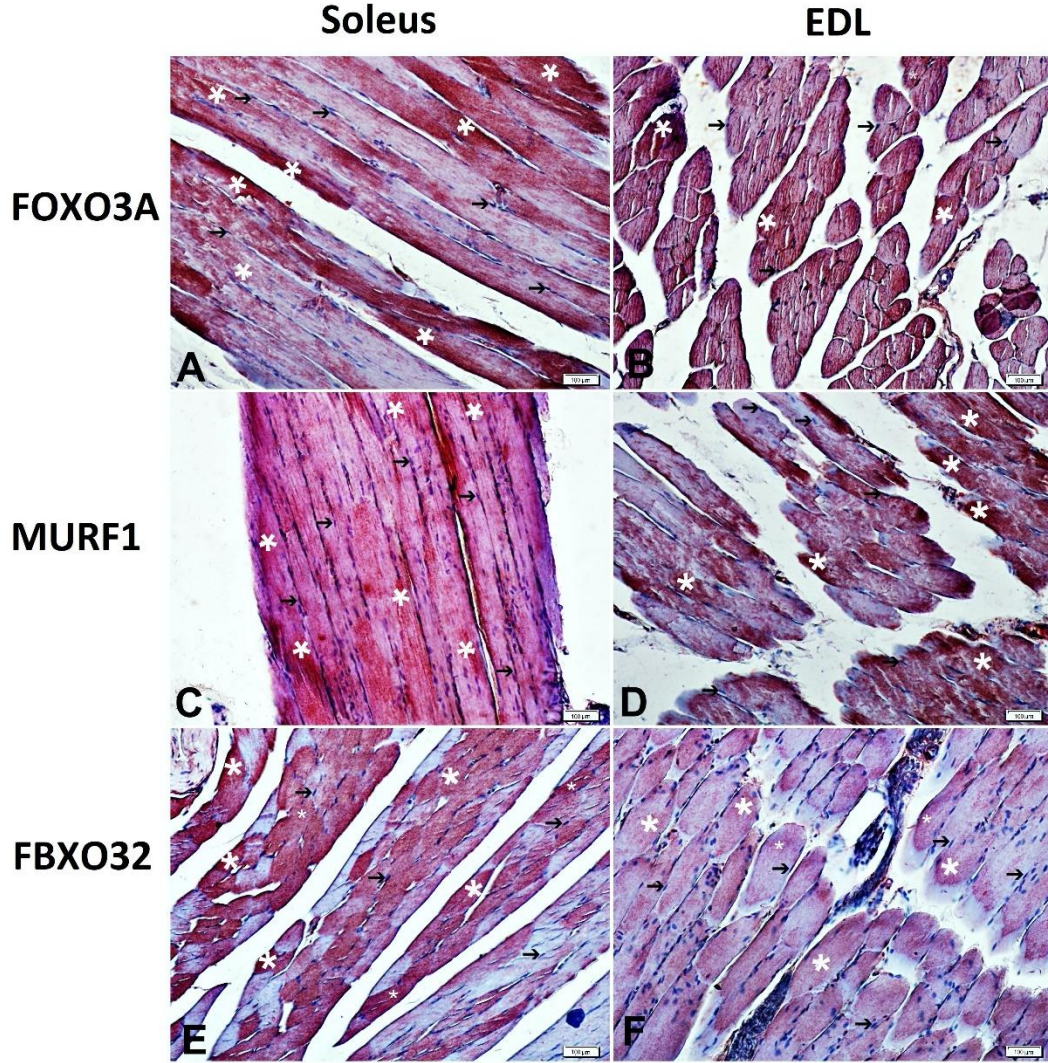
Kontrol grubundan alınan doku örneklerinde MuRF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonları, bazı alanlarda çok zayıf olarak izlenmekle birlikte, çoğu alanlarda boyanma gözlenmedi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Kontrol grubunda FOXO3A, MURF1 ve FBXO32 immunoreaktivitesi.

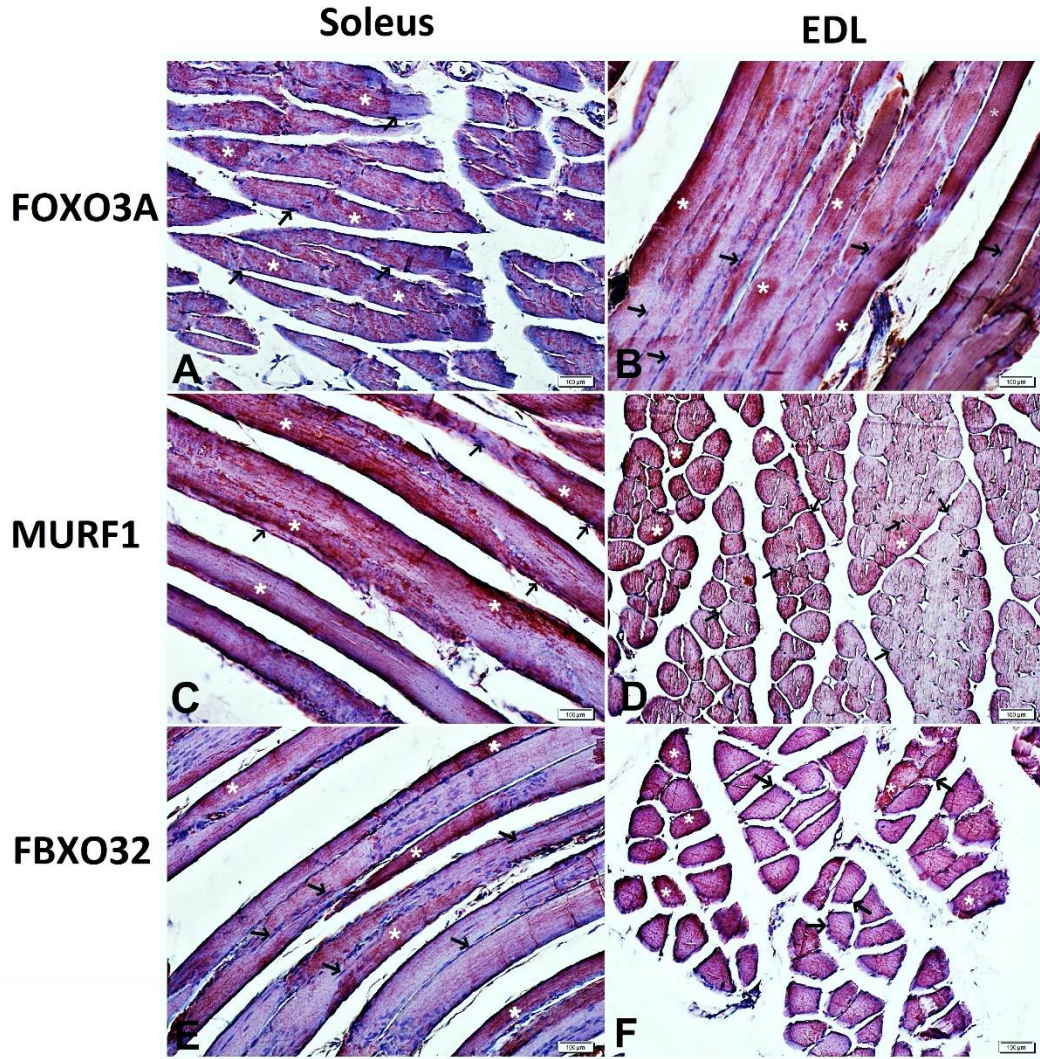
A) Soleus kasında FOXO3A immunoreaktivitesinin (*) minimal düzeyde olduğu ve periferik yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. B) EDL kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferik yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. C) Soleus kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferik yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. D) EDL kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferik yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. E) Soleus kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferik yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. F) EDL kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferik yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm

Diyabet oluşturulan gruptan (DM) elde edilen kas dokusu örneklerinde hem soleus hem de EDL kasına ait hücrelerin sitoplazmalarında MuRF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonlarının çok belirgin olduğu dikkati çekti (Şekil 4.36).



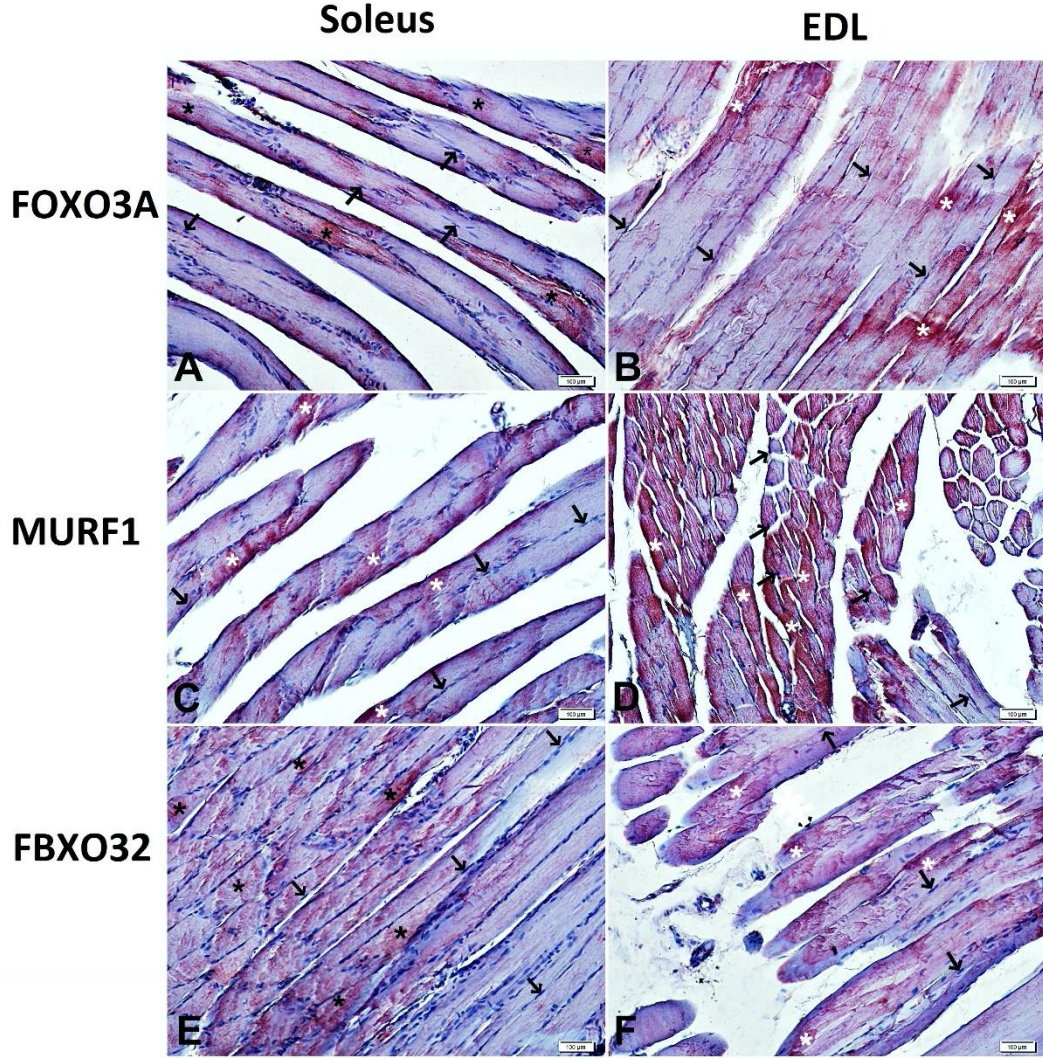
Şekil 4.36 Diyabet grubunda (DM) FOXO3A, MURF1 ve FBXO32 immunoreaktivitesi. A) Soleus kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. B) EDL kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. C) Soleus kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. D) EDL kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. E) Soleus kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. F) EDL kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m.

DM+PMA grubu immünohistokimyasal olarak incelemesinde, soleus ve EDL kaslarına ait hücrelerde MuRF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonlarının, yalnızca diyabet oluşturulan gruba yakın seviyelerde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.37).



Şekil 4.37 DM+PMA uygulanan grubun FOXO3A, MuRF1 ve FBXO32 immunoreaktivitesi. A) Soleus kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. B) EDL kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. C) Soleus kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. D) EDL kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. E) Soleus kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. F) EDL kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm.

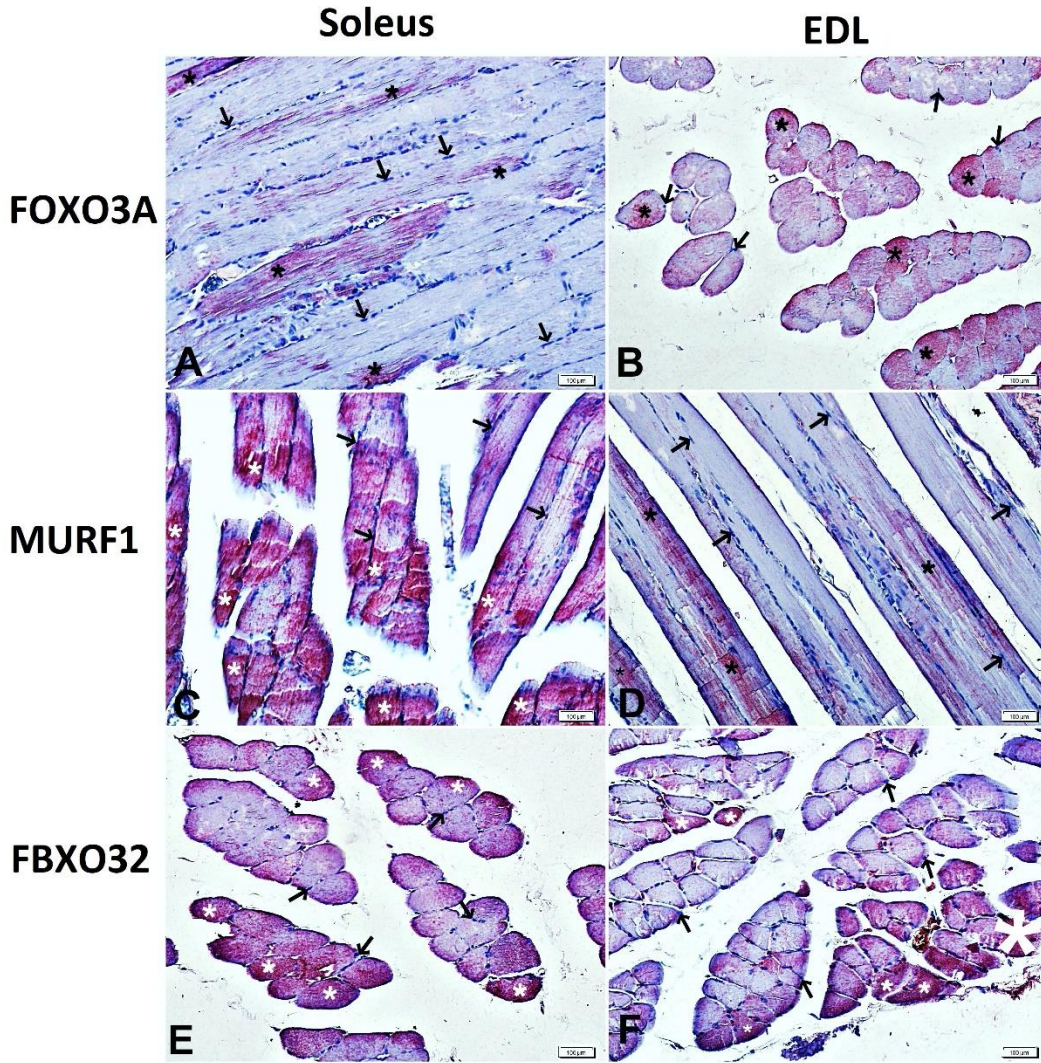
DM+R uygulanan gruptan elde edilen soleus ve EDL kaslarına ait hücrelerde, MuRF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonlarının yalnızca diyabet oluşturulan gruba göre oldukça azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.38).



Şekil 4.38 DM+R uygulanan grubun FOXO3A, MURF1 ve FBXO32 immunoreaktivitesi.

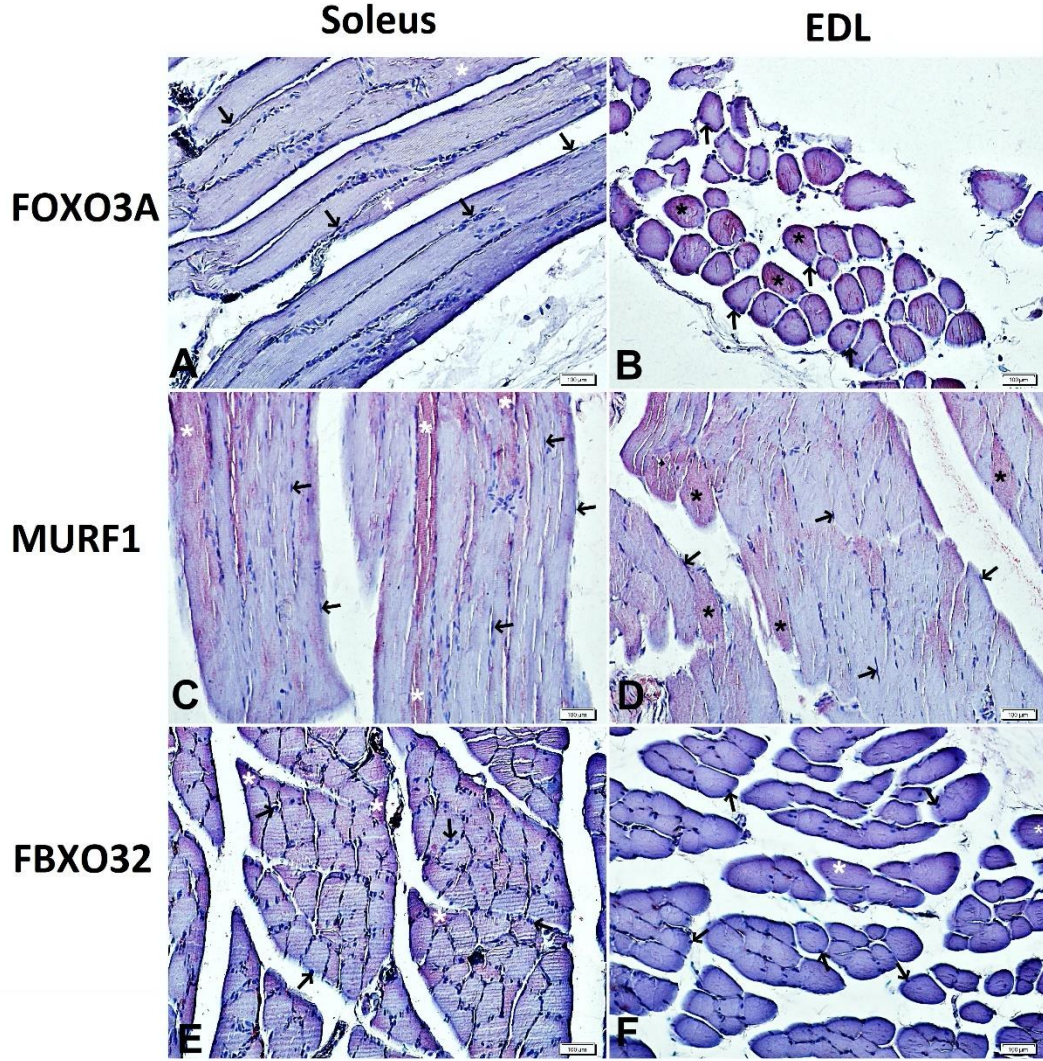
A) Soleus kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. B) EDL kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. C) Soleus kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. D) EDL kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. E) Soleus kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. F) EDL kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm.

DM+P uygulanan grupta, MuRF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonlarının her iki kasa ait hücrelerde azaldığı gözlenmekle beraber, ekspresyonlarda görülen bu azalmanın, özellikle EDL kas hücrelerinde, çok daha belirgin olduğu dikkati çekti (Şekil 4.39).



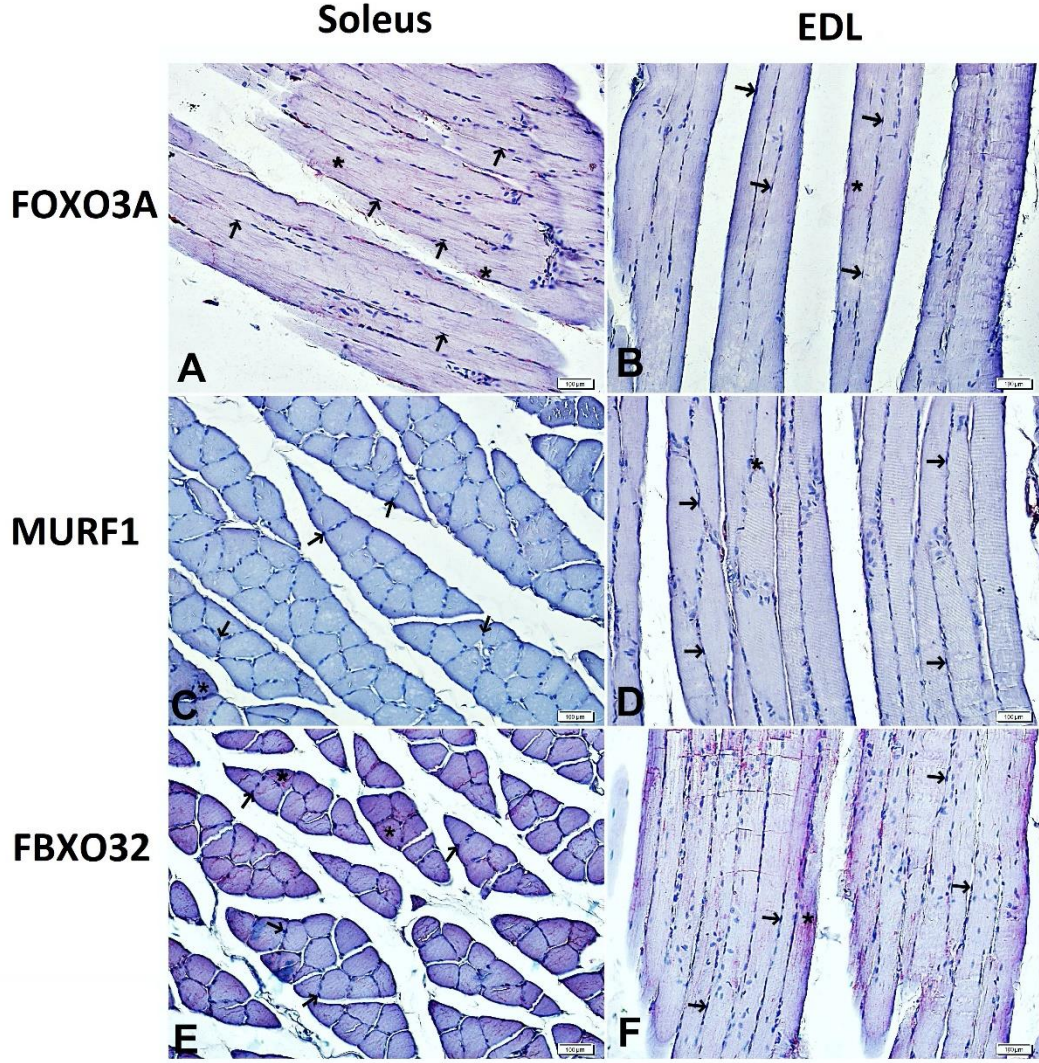
Şekil 4.39 DM+P uygulanan grubun FOXO3A, MURF1 ve FBXO32 immunoreaktivitesi. A) Soleus kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. B) EDL kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. C) Soleus kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. D) EDL kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. E) Soleus kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. F) EDL kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm.

DM+PMA+R uygulanan gruptan elde edilen her iki kasa ait hücrelerde, yalnızca diyabet oluşturulan gruba göre, MURF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonlarının belirgin şekilde azaldığı görüldü (Şekil 4.40).



Şekil 4.40 DM+PMA+R uygulanan grubun FOXO3A, MURF1 ve FBXO32 immunoreaktivitesi. A) Soleus kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. B) EDL kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. C) Soleus kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. D) EDL kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. E) Soleus kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm. F) EDL kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 µm.

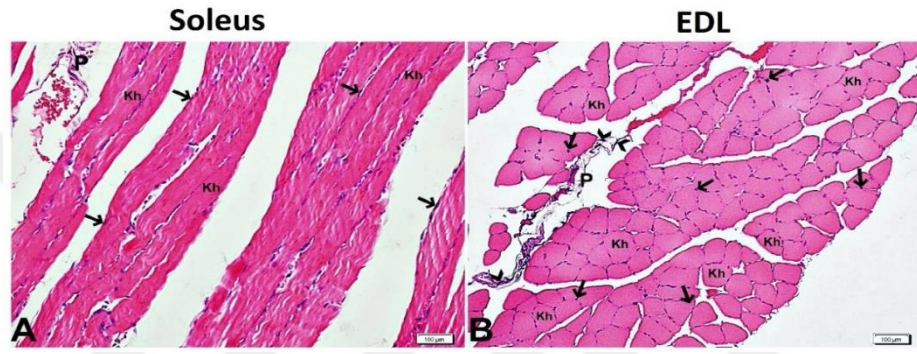
DM+PMA+P uygulanan grupta soleus ve EDL kaslarına ait hücrelerde, MuRF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonlarının oldukça belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41 DM+PMA+P uygulanan grubun FOXO3A, MURF1 ve FBXO32 immunoreaktivitesi. A) Soleus kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. B) EDL kasında FOXO3A immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. C) Soleus kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. D) EDL kasında MURF1 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. E) Soleus kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m. F) EDL kasında FBXO32 immunoreaktivitesi (*) ve periferal yerleşimli çekirdekler (oklar) izlenmektedir. Bar: 100 μ m.

4.9 Işık Mikroskopi Görüntüleri

K grubu soleus ve EDL kaslarına ait hücrelerin periferal yerleşimli çok sayıda çekirdeğe sahip olup, her bir kas lifinin normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. Kas liflerinin bir araya gelmesiyle oluşan kas fasikülleri, bağ dokusu olan perimisyum ile sarılıydı. Perimisyumda geniş kan damarları ve sinir lifleri bulunmaktaydı (Şekil 4.42). DM grubu, kas fasikül oluşumunda düzensizlikler ile birlikte kas bütünlüğünün bozulduğu dikkati çekti. Kas liflerinin periferal yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklere rastlandı (Şekil 4.43).



Şekil 4.42 Kontrol grubuna ait soleus ve EDL kas dokularının enine ve boyuna kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü.

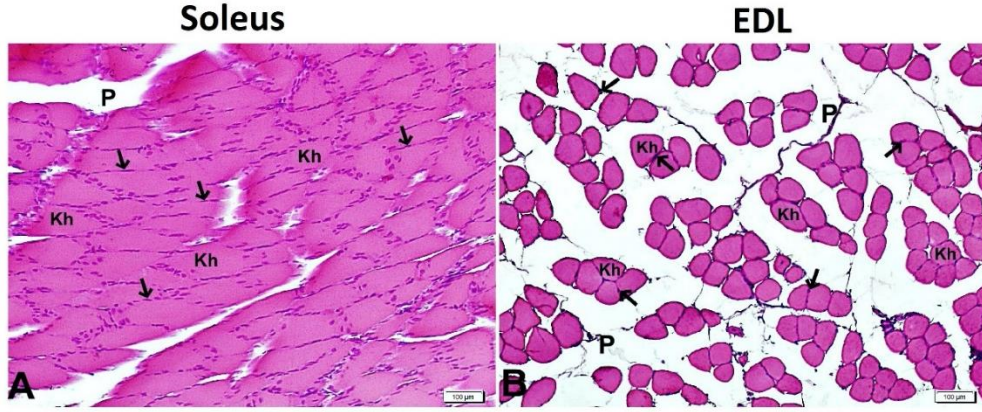
A) Soleus kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çok sayıda çekirdeğe (oklar) sahip oldukları izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm. B) EDL kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çok sayıda çekirdeğe (oklar) sahip oldukları izlenmektedir. Kas fasiküllerini saran perimisyumda (P) bağ dokusu lifleri ve fibroblastların çekirdekleri (ok başları) ayırt edilmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm



Şekil 4.43 Diyabet grubuna ait soleus ve EDL kas dokularının enine ve boyuna kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü.

A) Soleus kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çekirdeklerinin (oklar) çoğu alanda piknotik değişiklikler gösterdiği izlenmektedir. Kas fasikülünü saran perimisyum (P) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm. B) EDL kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli hücre çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.

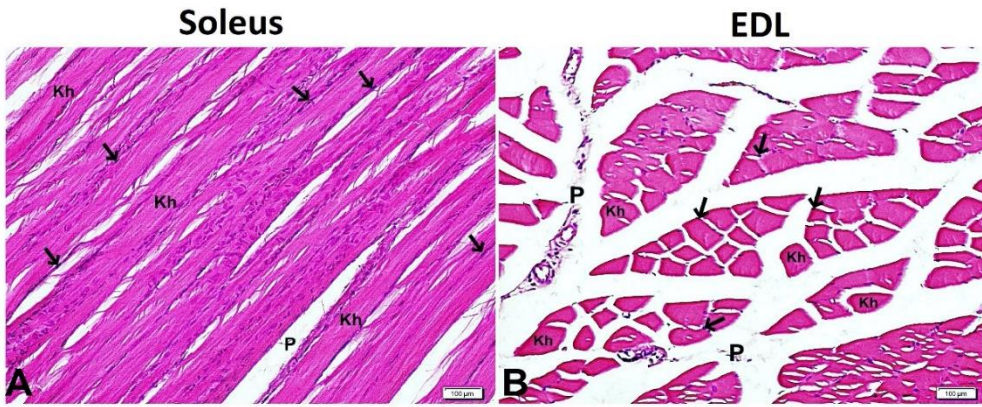
DM+PMA grubunda, DM grubuna kıyasla hem soleus hem de EDL kas liflerinin organizasyonlarının daha düzenli olduğu dikkati çekti. Ancak bazı alanlarda kas hücrelerinin periferel yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklerin devam ettiği görüldü (Şekil 4.44).



Şekil 4.44 DM+PMA uygulanan gruba ait soleus ve EDL kas dokularının enine ve boyuna kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü.

A) Soleus kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferel yerleşimli çekirdekleri (oklar) ve kas fasikülünü saran perimisyum (P) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm. B) EDL kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferel yerleşimli hücre çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.

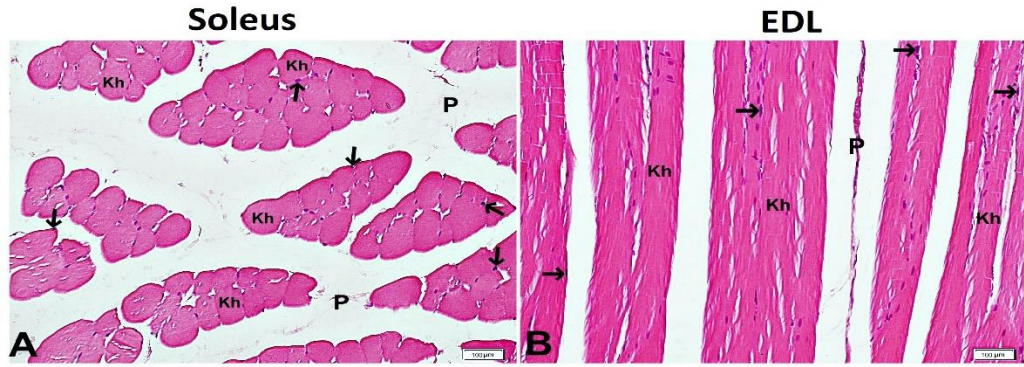
DM+R grubunda; soleus ve EDL kas liflerinin organizasyonunda DM grubuna göre anlamlı bir iyileşme gözlenmezken, kas liflerinin periferel yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklerin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.45).



Şekil 4.45 DM+R uygulanan gruba ait soleus ve EDL kas dokularının enine ve boyuna kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü.

A) Soleus kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferel yerleşimli çekirdekleri (oklar) ve kas fasikülünü saran perimisyum (P) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm. B) EDL kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferel yerleşimli hücre çekirdekleri izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 µm

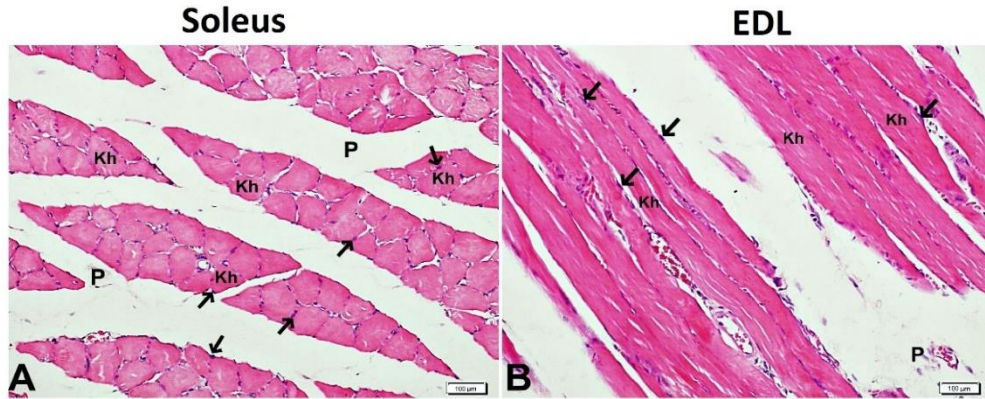
DM+P grubu soleus ve EDL kas liflerinin düzenlenmesinde ve liflerin bütünlüğünde diyabet grubuna göre anlamlı şekilde iyileşme olduğu gözlemlendi (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 DM+P uygulanan gruba ait soleus ve EDL kas dokularının enine ve boyuna kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü.

A) Soleus kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferik yerleşimli çekirdekleri (oklar) ve kas fasikülünü saran perimisyum (P) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm. B) EDL kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferik yerleşimli hücre çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.

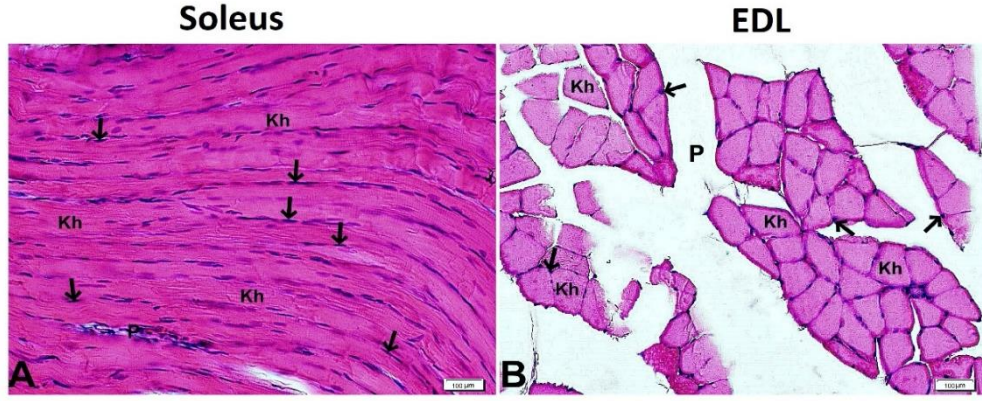
DM+PMA+R grubu soleus ve EDL kaslarına ait bireysel kas liflerinde ve kas fasikül organizasyonunda, DM grubuna göre anlamlı şekilde iyileşme olduğu ve piknotik çekirdek sayısının belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.47).



Şekil 4.47 DM+PMA+R grubuna ait soleus ve EDL kas dokularının enine ve boyuna kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü.

A) Soleus kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferik yerleşimli çekirdekleri (oklar) ve kas fasikülünü saran perimisyum (P) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm. B) EDL kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferik yerleşimli hücre çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm

DM+PMA+P grubu, kas hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarının nispeten normal yapıda olduğu ve K grubuna benzer şekilde kas liflerinin bütünlüğünde ve organizasyonunda iyileşme kaydedildiği dikkati çekti (Şekil 4.48).



Şekil 4.48 DM+PMA+P grubuna ait soleus ve EDL kas dokularının enine ve boyuna kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü.

A) Soleus kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferel yerleşimli çekirdekleri (oklar) ve kas fasikülünü saran perimisyum (P) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm. B) EDL kasına ait kas hücrelerinin (Kh) periferel yerleşimli hücre çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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 (19, 43, 64). Tip-1 DM’li insanlar üzerinde yapılan ilk çalışmalar, kapiler yoğunlukta fark olmadığını bildirirken (177), Tip-1 DM’li farelerde yapılan araştırmalar ise iskelet kası kapilarizasyonunda ve anjiyogenezinde bir düşüş olduğunu göstermiştir (178). Kas yapısı ve metabolizmasındaki bu değişiklikler genellikle kas fonksiyonlarındaki azalmalarla ilgilidir (75, 179-181). Büyüme ve yapısal fonksiyona ek olarak, kas rejenerasyonu çalışmalarında belirtildiği gibi, atrofik hasarlanmalar ve tamir mekanizması Tip-1 DM’den olumsuz olarak etkilenmektedir (42, 182-185).

STZ’nin indüklediği Tip-1 DM’li wistar albino erkek sıçanlarda (350-400g, n=10) yapılan bu çalışmada, soleus ve ekstensor digitorum longus iskelet kaslarında meydana gelen atrofik mekanizma ve metabolik aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelendi. Tip-1 DM’li sıçanların bozulan protein ve gen aktivitelerinin iyileştirilmesine katkıda bulunacağını düşündüğümüz ve günümüz alternatif tıbbında da yaygın olarak kullanılmaya başlanan antioksidan (pterostilben ve resveratrol) ve pulslu manyetik alan uygulamalarının diyabetik sıçanlar üzerindeki etkisi değerlendirildi. Özellikle çalışmada, yavaş kasılan (soleus) ve hızlı kasılan (EDL) tipte iki ayrı kas dokusunun incelenmesi iskelet kasları özelinde daha geniş ve ayrıntılı yorumlar yapmamıza olanak sağladı.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, DM grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarının K grubuna göre % 30,41 oranında azaldığı görüldü. P+PMA uygulamasının DM’ye göre % 48 vücut ağırlık kaybını önlediği tespit edildi. P ve R antioksidanları hemen hemen benzer etkiyi gösterdi. Bulduğumuz sonuçlar, Manickam ve arkadaşlarının (186) STZ ile indüklenmiş sıçanlarda, pterostilben uygulamasının (oral) sıçanlarda vücut ağırlık kaybını % 20 önlediği yönündeki bulgular ile uyumludur. Çalışmamızda ağırlık kaybının daha belirgin önlenmesi, antioksidanların i.p. olarak uygulanmasına bağlanmaktadır. Deney sonunda, sıçanların nemli kas ağırlıkları tartıldı ve DM grubunda görülen kas zayıflamalarının antioksidan ve PMA uygulamalarıyla iyileştirildiği gözlemlendi. EDL kaslarında kas ağırlık kaybı soleus kaslarına göre daha fazla olmuştur.

Grupların soleus kas ağırlıklarında anlamlı farklılıklar gözlenmezken, EDL kas ağırlıklarında pterostilben antioksidanın PMA ile birlikte uygulamasının DM grubuna göre (% 32,88) kas ağırlığını anlamlı olarak artırdığı bulundu. İlginç bir şekilde, EDL kaslarında resveratrol antioksidanı pterostilben antioksidanından daha etkiliyken, PMA+P uygulaması resveratrol ve PMA+R uygulamasından daha etkili olmuştur. Soleus ve EDL kaslarında görülen kas ağırlık kayıpları atrofinin ön belirtilerinden olmaktadır (187). Tip-1 DM ile kan glikoz ve insülin seviyelerinde bozunmalar görülmekte, iskelet kaslarının kasılma ve histolojik görüntülerinde geri dönüşümsüz hasarlanmalar olabilmektedir (44, 188). Enjekte edilebilir insülin kullanımının maliyet ve uygulama zorlukları yanında, Bölüm 2.1.1’de de değinildiği gibi Tip-1 DM’li bireylerde, yoğun insülin kullanım programlarına katılmalarıyla, insüline karşı direnç gelişebilmektedir (33, 34). Bu sebeplerle alternatif tedavi yöntemlerine olan ilgi gittikçe artmaktadır (189). Çalışmamızda, DM grubunda artan kan glikoz ve azalan insülin seviyelerinin P, PMA+P ve PMA+R uygulamalarıyla anlamlı farklılıkta iyileşme gösterdiği bulundu. R grubu DM grubuna göre % 20,43 kan glikoz artışını azaltsa da bu anlamlı bir farklılık ifade etmedi. DM grubuna göre serum insülin seviyelerinin artışına baktığımızda, bütün grupların anlamlı düzeyde iyileştirme yaptığı gözlemlendi. İnsülin seviyelerindeki iyileşmenin kan glikoz seviyelerindeki iyileşmeden daha etkili olması, GLUT-4 aktivasyonu ve pankreatik beta hücre yenilenmesiyle ilişkilendirilmektedir. Uygulanan yöntemlerin beta hücreleri üzerinde olumlu etkilerinin daha yoğun olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bu yorum daha önce pterostilbenin beta hücre granüllenmesine katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalarla desteklenmektedir (190). Çalışmada, sıçanların koşu bandı performanslarına bakılarak iskelet kaslarındaki güç geri kazanımı kıyaslandı. Diyabetik sıçanlarda, P ve PMA+P uygulamasının anlamlı bir şekilde sıçanların daha uzun mesafe yol kat edebilmelerine katkıda bulunduğu gözlemlendi. R, PMA ve PMA+R uygulamalarının DM grubuna göre anlamlı farklılıklar göstermediği gözlemlendi. Pterostilben uygulamasının baskın olarak güç geri kazanımına yardımcı olduğu görüldü. Bu durum, kas zayıflamalarına ve güçsüzlüğüne sebep olan miyopatik sürecin iyileştirmesine katkı olarak yorumlandı. Gruplar arasındaki yorgunluk zamanı farklılıklarına bakıldığında, sadece PMA+P uygulamasının anlamlı düzeyde yorgunluğu geciktirdiği gözlemlendi.

Çalışkan ve arkadaşları koşu bandı egzersiz programının Tip-1 Diyabet üzerindeki etkilerini çalışmış ve bunu Tip-1 DM ile zayıflayan/güç kaybı gösteren sıçanların performanslarını değerlendirmede kullanmıştır. DM grubuna göre daha kısa mesafe ve çabuk yorgunluk gösteren sıçanlar, uygulanan egzersiz programıyla güç geri kazanımı göstermiştir (191).

Elde ettiğimiz biyomekanik kayıtlamalarda, K grubu EDL kaslarının soleus kaslarına göre daha büyük kuvvetlerde kasıldığı fakat STZ indüklenmesiyle soleus kaslarında % 24,18 EDL'de % 34,31 oranında tek sarsı kuvvet kaybı olduğu gözlemlendi. Bu durum daha önceki çalışmamalarda da belirtildiği gibi atrofik koşullara karşı EDL kaslarının daha hassas olduğunu göstermektedir (67, 68, 74). DM grubunda, kasılma süresinin soleus kaslarında daha çok uzarken, gevşeme süresinin EDL kaslarında daha çok uzadığı bulundu. Diyabetik koşullarda kasılma ve gevşeme mekanizması göz önüne alındığında, yavaş kasılan kaslarda, kasılma proteinleri ve Ca^{+2} 'nin troponin C'ye bağlanma ilgisinin EDL'ye göre daha çok azalması ile ilişkilendirilebilir (192). EDL kaslarında antioksidan ve PMA uygulamalarının DM grubuna göre anlamlı kuvvet artışı sağladığı bulunurken, soleus kaslarında anlamlı farklılık bulunmadı. Tetanik kasılma yanıtlarına baktığımızda, DM grubuna göre her iki kas için de antioksidan ve PMA uygulamalarının anlamlı düzeyde kuvvet artışı sağladığı görüldü. Bütün gruplarda, soleus ve EDL kaslarında birbirine çok yakın tetanik kasılma kuvveti iyileştirmeleri gözlemlendi. Elde edilen bulgular daha önce Frayse ve arkadaşlarının soleus ve EDL kaslarında Ca^{+2} homeostazisine bağlı olarak gerçekleştirdikleri kuvvet yanıtlarıyla ve Moran ve arkadaşlarının yaşa bağlı olarak yaptıkları araştırmalarla tutarlıdır (193, 194). Kuvvet kaybının EDL kaslarında daha belirgin olması, soleus kaslarına göre daha fazla normal olmayan kasılmalar ve sistolik Ca^{+2} konsantrasyonuna sahip olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

İskelet kas atrofisinde, kasılma proteinlerinin ve bazı genlerin ekspresyonlarının olumsuz etkilendiği bilinmektedir (42). Bu sebeple, atrofi ve hipertrofi sinyal yolları üzerinde önemli rol oynayan protein ve genlerin analizi bu çalışmada yapıldı ve uygulanan yöntemlerin karşılaştırmalı etkileri incelendi.

Doğal bir antioksidan olan Resveratrol (R)'nin bazı in vitro çalışmalarda protein bozulmasını önlediği ve iskelet kas lifi atrofisini azalttığı gösterilmiştir (91, 195-197). RSV'nin, NF-kB aktivitesini ve MuRF1 gen ekspresyonunu inhibe ederek, anti-kaşektik etki yaptığı belirtilmektedir (198). TNF- α indüklenmesiyle oluşturulan atrofi modelinde, AKT'nin mTOR, p70S6K ve 4E-BP1 fosforilasyonunu sağlayarak (195), deksametazon indüklenmesiyle oluşturulan atrofi modelinde ise, SIRT1 ve PGC-1 α aktivasyonu yoluyla MAFbx ve MuRF1 gen ekspresyonlarını azalttığı ve atrofik süreci baskıladığı ifade edilmiştir (196). Resveratrol, sahip olduğu güçlü antioksidan özelliği, uygulanma ve deneysel çalışmalarda kullanılma sıklığından dolayı bu çalışmada kısmen pozitif kontrol antioksidanı olarak tercih edildi. Bununla birlikte, bilimsel araştırmalarda bu kadar ilgi gören resveratrol'ün diyabetik iskelet kas atrofisindeki terapötik etkinliğini kapsamlı bir şekilde gösteren araştırma sayısı çok azdır, çalışmamızda ayrıntılı olarak incelenme fırsatı oldu.

Pterostilben (P)'nin nörolojik, kardiyovasküler, metabolik ve hematolojik hastalıklar dâhil olmak üzere çok çeşitli insan hastalıklarında koruyucu ve terapötik özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (199). Resveratrol ve pterostilben arasında yapısal ve biyo-aktivite benzerlikleri olsa da, pterostilben'in farmakolojik özelliklerinin genellikle resveratrol'den daha güçlü olduğu kabul edilir (137, 200, 201). İki metoksi grubu ve bir hidroksil grubuna sahip olan pterostilben, üç hidroksil grubuna sahip R'den daha yüksek lipofilikliğe ve hücre alım potansiyeline sahiptir (123). Ayrıca, pterostilben, resveratrol ile karşılaştırıldığında daha uzun bir yarı ömre (14 dakikaya karşı 105 dakika) ve daha yüksek oral biyoyararlanıma (% 20'ye karşı % 80) sahiptir (137, 148, 202, 203). Literatürde, diyabetik iskelet kas atrofisi üzerine yapılan araştırmalarda pterostilben uygulamasının çok fazla kullanılmadığını gördük. Bu sebeple, ilk olarak pterostilben'in diyabetik sıçanların gastrokinemius kaslarındaki etkilerini deneysel olarak inceledik ve çeşitli parametreler üzerinden iyileştirici etkileri olduğunu gözlemledik (16). Yaptığımız çalışmada diyabetik atrofideki sinyal iletim yolları, gen ekspresyon değişimleri ve immünohistokimya analizleri incelenememişti, bu yüzden kullanılan antioksidanların etki mekanizmaları tam olarak açıklanamadı.

Planlanan bu çalışmayla birlikte diyabetik atrofide pterostilben'in etki mekanizması iki farklı kas dokusu üzerinden daha ayrıntılı olarak ele alınabildi. STZ indüklenmiş farelerde oluşan iskelet kas atrofisi incelendiğinde; 1500 mg/kg/gün dozda kurkumin uygulamasının farelerin vücut ağırlıklarını, iskelet kas ağırlıklarını, kas lifi kesit alanlarını artırdığı görülmüştür. Ayrıca, uygulanan kurkumin'in ubiquitinlenmiş protein miktarını azaltarak, diyabetik sıçanlarda artış gösteren MuRF-1 ve MAFbx gen ekspresyonlarını da inhibe ettiği iddia edilmiştir (204).

Resveratrol üzerine çok fazla bilimsel çalışma yapılmış ve düşük dozlarda antioksidan, yüksek dozlarda ise pro-oksidan etkisinin olduğu ifade edilmiştir (205). Antioksidan dozları belirlenirken deneysel çalışmalardaki uygulamalar da göz önünde bulunduruldu (122, 206-208). Hem yüksek dozlarda nutrasötik alımından sakınmak, hem de deneysel etkinliği gözlenen antioksidanların daha az maliyetle üretilmesini kolaylaştırmak adına bu çalışmada düşük dozda (20 mg/kg) Resveratrol ve Pterostilben antioksidanlarının karşılaştırmalı etkilerini inceledik.

Yapılan bir çalışmada, 6 hafta boyunca 30 dk./gün, 15 Hz (1.46 mT) uygulanan pulslu elektromanyetik alan uygulamasının, STZ indüklenmiş sıçanların vücut ağırlıklarını, kas kuvvetini, kas kütlesini ve insülin seviyelerini artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, diyabetik sıçanların kan glikoz seviyelerinde azalma ve AKT aktivesinde artma olduğu belirtilmiştir. AKT aktivitesine bağlı olarak, myostatin, ActRIIB ve FOXO1 aktivitesinin de inhibe edildiği ifade edilmiştir (168). Çok düşük frekanslardaki PMA (≤ 300 Hz) uygulamasının biyolojik sistemler üzerinde 'termal olmayan' etkiler indüklediği (209) ve STZ indüklenmiş diyabetik nefropatili sıçanların böbrek yapısındaki patolojik değişiklikleri hafiflettiği histolojik incelemelerle gösterilmiştir (210). Manyetik Allan uygulamalarında "Adey Penceresi" olarak adlandırılan bir uygulama sitemi mevcuttur. Bu sisteme göre, doğru manyetik alan uygulamasının, hedef hastalık veya organ tedavisinde terapötik etkinliği arttırdığı ifade edilmektedir. Enerjinin iletilmesi, en uygun pencerenin "vurulması" olarak adlandırılır ve manyetik alanın gücü (genlik, yoğunluk), atımı (frekans), işlem süresi ve dolayısıyla enerji dağıtım şekli gibi parametreleri içerir. En uygun biyo ve klinik etkiler bu birleştirilmiş doz uyumu ile elde edilmektedir. Optimal pozisyondan uzaklaştıkça müdahale daha az etkili olmaktadır (154).

PMA uygulamalarının birçok iyileştirici etkilerinin olduğu ifade edilmekle birlikte etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (173). Planladığımız çalışmada, çok düşük frekans olarak kabul edilen 10 Hz ve 1.5 mT PMA'nın diyabetik iskelet kas atrofisi araştırmalarındaki etkilerini test etmeyi ve çok yönlü analizlerle de etki mekanizması hakkında literatüre katkıda bulunmayı amaçladık. Etki mekanizmasının doğru bir şekilde belirlenmesiyle, diyabetik iskelet kası atrofisi rahatsızlıklarında, daha verimli iyileştirici yöntemlerin geliştirilmesi ve klinik araştırmalardaki uygulanabilirliği sağlanmış olacaktır. Örneğine sadece bir çalışmada rastladığımız, 50 Hz (1 mT) manyetik alan uygulamasıyla birlikte 10 mg/kg dozda pterostilben uygulamasının böbrek iskemi-reperfüzyonundaki etkileri incelenmiş ve iskemik hasar üzerinde tedavi edici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar pterostilben'in endojen antioksidan sistemler üzerine olumlu etki yaparak serbest radikallere karşı savunmada rol aldığını ifade etmiştir (211).

Çalışmamızdan elde edilen bulgular ışığında, FOXO3a protein konsantrasyonunun EDL kaslarında daha fazla bulunduğu dikkati çekti. Soleus ve EDL kaslarında, pterostilben ve resveratrol uygulamaları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. DM grubuna göre DM+PMA uygulaması EDL kaslarında anlamlı bir farklılık yapmazken, soleus kaslarında anlamlı düzeyde konsantrasyonu azaltmıştır. Katabolik yolak içerisinde kas atrofisini artıran TNF- α konsantrasyonları DM grubu EDL kaslarında soleus'a göre daha fazla bulundu. DM grubuna göre hem soleus hem de EDL kaslarında antioksidan ve PMA uygulamalarının benzer düzeyde iyileştirme etkisine sahip olduğu gözlemlendi. Resveratrol'un pterostilben'e ye kıyasla % 15-16'lık bir farkla etkili olduğu gözlemlendi. Dağdeviren ve arkadaşları da STZ indüklenmiş diyabetle birlikte TNF- α ve FOXO konsantrasyonlarının değiştiğini göstermişlerdir (212). MSTN protein analizinden elde edilen bulgular, bozunmanın EDL kaslarında daha fazla olduğunu gösterdi. DM grubuna göre, resveratrol hem soleus hem de EDL kaslarında anlamlı bir fark yapmazken, PMA+R uygulaması her iki kasta da anlamlı düzeyde iyileştirme yaptı. Bu durum PMA etkisiyle resveratrol aktivasyonunun MSTN protein sentezi üzerinde artabileceği (her iki kasta, yaklaşık % 5 artış) şeklinde yorumlandı.

Diğer taraftan, pterostilben antioksidanı PMA ile birlikte uygulandığında, etkinliği her iki kasta da yaklaşık % 10-12 oranında arttı. Hasarlanmış sarkomerik proteinlerin Ub-P sistem aracılığıyla atılmasını kolaylaştıran ve atrofinin şiddetli olduğunun belirtisi olan CAPN-3 protein düzeyleri incelendiğinde, Ito ve arkadaşlarının da kendi çalışmalarında belirttiği gibi (13) DM grubunda CAPN-3 seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda, en fazla CAPN-3 derişiminin EDL’de olduğu görüldü. Gruplar arasında, CAPN-3 düzeylerinin iyileştirilmesinde resveratrol’ün daha etkili olduğu belirlendi. p-AKT protein düzeyleri analiz edildiğinde, soleus kaslarında DM+PMA grubu dışındaki gruplar K’dan anlamlı olarak farklı değilken, EDL kaslarında P ve P+PMA uygulamaları dışında diğer gruplar K’dan anlamlı düzeyde farklılık göstererek azalmıştır. p-AKT protein kaybından EDL en fazla etkilenen kasken DM grubuna göre geri dönüşümün EDL kaslarında daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu durum EDL kaslarının pterostilben antioksidan uygulamasına daha hızlı yanıt verdiği şeklinde yorumlandı. mTOR protein analiz bulgularına göre, DM grubunda azalan mTOR seviyesinin PMA+P uygulamasıyla anlamlı düzeyde iyileştirildiği görüldü. En fazla kayıp EDL kasında gözlemlendi. DM grubuna göre, PMA uygulaması tek başına en az etkiyi bu protein üzerinde göstermiştir. Öyle ki, resveratrol uygulaması DM grubuna göre % 50,88 ve % 54,40 (soleus ve EDL) iyileştirme yaparken, PMA+P uygulaması bu oranı % 41,05 ve % 52,75’e (soleus ve EDL) düşürmüştür. MyHC IIb protein ekspresyonları; DM grubuna göre soleus ve EDL kaslarında resveratrol uygulaması anlamlı etki etmezken pterostilben uygulaması daha etkili olmuştur. Kasılma proteinlerinden olan MyHC IIb, izometrik tek sarsı ve tetanik kasılma kuvvet artışında gözlemlediğimiz pterostilben uygulamasının etkisini doğrular nitelikte iyileştirilmiştir. Daha önceki proteinler üzerinde ya anlamsız ya da çok az anlamlı düzeyde etki eden PMA uygulaması GLUT-4 protein seviyelerinde en fazla anlamlı iyileştirici etki yaptığı gözlemlendi. Bu etki daha çok EDL kaslarında gözlemlendi. PMA uygulamalarının kanal kapıları üzerinde etkili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmişti (174, 213). Burada GLUT-4 kanal aktivasyonu ve translokasyonunun PMA uygulamasıyla artırıldığı yorumu yapıldı

Gen ekspresyon analizlerine bakıldığında, protein degradasyonunda etkili olan 4E-BP1 gen ekspresyonunun DM grubunda arttığı bulundu. Daha önceki protein analizlerinden farklı olarak en fazla bozunmanın soleus kasında olduğu dikkat çekti. Her iki kasta da PMA+P uygulaması en fazla etkiye sahip olmuştur.

DM grubuna göre diğer gruplar karşılaştırıldığında PMA uygulaması dışında diğer grupların anlamlı düzeyde iyileştirici etki ettiği görüldü. Alamdari ve arkadaşları, TNF- α indüklenerek oluşturulan atrofi modelinde resveratrol antioksidan uygulamasının 4E-BP1 fosforilasyonunu yukarı regüle ederek atrofiyi engellediğini göstermiştir (195). Biz de çalışmamızda DM grubuna göre R uygulamasının % 28,97 ve % 35,47 (soleus ve EDL) etkili olduğunu gözlemledik.

FOXO3a gen ekspresyon analizlerine baktığımızda; DM grubunda artan FOXO transkripsiyon faktörlerinin, diyabetik soleus kaslarında diyabetik EDL kaslarına göre daha fazla olduğu görüldü. PMA uygulaması tek başına anlamlı farklılık göstermezken, EDL kaslarında PMA+R değerleri kontrole yaklaştırmıştır. Resveratrol antioksidanı FOXO3a gen ekspresyon düzenlenmesinde pterostilben'den % 14,61 ve % 11,11 (soleus ve EDL) daha fazla etki göstermiştir. MAFbx ve MuRF-1 gen ekspresyon analizleri incelendiğinde, MAFbx düzenlenmesinde pterostilben antioksidanının resveratrol'den % 12,50 ve % 19,26 (soleus ve EDL) daha etkili olduğu, MuRF-1 düzenlenmesinde ise resveratrol antioksidanının pterostilben'den % 26,56 ve % 29,08 (soleus ve EDL) daha etkili olduğu görüldü. Bu sonuçlar daha önce Wang ve arkadaşlarının (196, 201, 214, 215)yaptıkları çalışmalarla uyum göstermiştir.

MuRF1, FBXO32 ve FOXO3a ekspresyonları immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Kontrol grubundan alınan doku örneklerinde MuRF-1, FBXO32 ve FOXO3a ekspresyonları, bazı alanlarda çok zayıf olarak izlenmekle birlikte, çoğu alanlarda boyanma gözlenmedi. Buna karşın, diyabet oluşturulan gruptan elde edilen kas dokusu örneklerinde hem soleus hem de EDL kasına ait hücrelerin sitoplazmalarında MuRF1, FBXO32 ve FOXO3A ekspresyonlarının çok belirgin olduğu dikkati çekti. Shereen ve arkadaşları L-karnitin uygulanan Tip-2 DM'de MuRF-1 immünohistokimyasal seviyelerde düzelme olduğunu ifade etmiştir (216). Elde edilen immünohistokimya bulgularına göre, PMA uygulaması belirgin iyileştirmeler yapmamıştır.

Resveratrol antioksidan uygulaması sadece DM grubuna göre ekspresyon seviyelerinde azalma yapmıştır. Pterostilben uygulamasının EDL kaslarında soleus'a göre daha belirgin düzenleme yaptığı gözlemlendi.

Metti ve arkadaşları da polifenol pterostilben uygulamasının otofaji indüklenmiş iskelet kas miyopatisinde iyileştirici etkileri olduğunu ifade etmiştir (217). PMA+P uygulanan grupta soleus ve EDL kaslarına ait hücrelerde, MuRF-1, FBXO32 ve FOXO3Aa ekspresyonlarının oldukça belirgin olarak azaldığı gözlemlendi.

Diyabet oluşturulmayan ve herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubuna ait kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde; soleus ve EDL kaslarına ait hücrelerin periferik yerleşimli çok sayıda çekirdeğe sahip olup, her bir kas lifinin normal morfolojiye sahip olduğu görüldü.

Resveratrol antioksidanı ve PMA+R uygulanan grubun ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, soleus ve EDL kas liflerinin organizasyonunda DM grubuna göre anlamlı bir iyileşme gözlenmezken, kas liflerinin periferik yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklerin devam ettiği gözlemlendi. P ve PMA+P uygulamalarının diğer gruplardan ve DM grubundan daha fazla düzenleyici etki gösterdiği görüldü.

Daha önce diyabetik iskelet kası atrofisi araştırmalarında, özellikle 2 farklı kas türünde, bu kadar antioksidanın bir arada kullanıldığı ve PMA uygulaması ile birlikte etkilerinin araştırıldığı çalışmaya rastlanılmadı. Bu bakımdan kullanılan yöntemlerin, moleküler, genetik, histolojik, biyomekanik ve fiziksel performans testleriyle desteklenerek, elde edilen veriler ışığında diyabetik atrofi süreçlerini aydınlatıcı bir çalışma olması amaçlandı. Aynı zamanda, bu çalışmanın sadece bu çalışmada kullanılan antioksidan ve PMA uygulamalarında değil, diğer alternatif terapi yöntemlerinde de olası etki mekanizmalarını ve diyabetik iskelet kası atrofisindeki uygulanabilirliklerini gösteren bir kaynak araştırma olması hedeflendi. Son zamanlarda diyabet hastalığında bitkisel ilaçların biyolojik ve tıbbi özelliklerini araştıran çalışmalara artan bir ilgi vardır. Bu çalışmada planlanan detaylı ve çok yönlü analizlerle birlikte ilk defa hem yavaş hem de hızlı kasılan iskelet kaslarındaki diyabetik atrofiye bağlı olarak gelişen metabolik süreçlerin makro ölçekten mikro ölçeğe kadar bütünsellik içerisinde ele alınması planlandı.

Sonuç olarak elde edilen bulgulara göre, antioksidan uygulamalarının atrofik sinyal yollarını düzenlemede etkili olduğu, özellikle pterostilben antioksidanının resveratrol'e kıyasla daha fazla parametre üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu görüldü. PMA uygulaması tek başına anlamlı düzeyde etki yapmazken, antioksidanlarla kullanımında iyileşmeyi artırıcı yönde etkisinin daha fazla olduğu görüldü. Bu bakımdan, diyabetik atrofiye bağlı gelişen anormalliklerin terapötik etkinliği bilinen pterostilben ve resveratrol antioksidanları ve non-invazif PMA uygulamalarıyla iyileştirilmesi yönünde daha ayrıntılı çalışmalar planlanmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan pterostilben, resveratrol antioksidanları ve pulslu manyetik alan uygulamalarından elde edilen bulguların, diyabetik iskelet kas atrofisi konusunda yapılan farmakolojik araştırmalara yardımcı olmasını ve tıpta alternatif tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkı sağlamasını bekliyoruz. Diyabetik gruplarda gözlenen bozulmuş atrofik mekanizmanın, uygulanan yöntemlerle olası iyileşmeleri ve kas atrofisi sinyal yollarındaki etkileri ayrıntılı olarak incelendi. Buradan elde edilen bulguların, diyabetik kas atrofisi rahatsızlığı çeken hastaların kullanımı için geliştirilen nutrasötik ilaç çalışmalarında da faydalı olacağına 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.

6. KAYNAKÇA

1. **Rom O., Reznick A. Z.** The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. *Free Radic Biol Med*, **2016**; 98: 218-230.
2. **Fanzani A., Conraads V. M., Penna F., Martinet W.** Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **2012**; 3(3): 163-79.
3. **Bodine S. C., Baehr L. M.** Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2014**; 307(6): E469-84.
4. **Lee S. W., Dai G., Hu Z., Wang X., Du J., Mitch W. E.** Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol*, **2004**; 15(6): 1537-45.
5. **McKinnell I. W., Rudnicki M. A.** Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell*, **2004**; 119(7): 907-910.
6. **Zhang J., Zhuang P., Wang Y., Song L., Zhang M., Lu Z., Zhang L., Wang J., Alemu P. N., Zhang Y., Wei H., Li H.** Reversal of muscle atrophy by Zhimu-Huangbai herb-pair via Akt/mTOR/FoxO3 signal pathway in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One*, **2014**; 9(6): e100918.
7. **Kang S. H., Lee H. A., Kim M., Lee E., Sohn U. D., Kim I.** Forkhead box O3 plays a role in skeletal muscle atrophy through expression of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogin-1 in Cushing's syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2017**; 312(6): E495-E507.
8. **Okamoto T., Machida S.** Changes in FOXO and proinflammatory cytokines in the late stage of immobilized fast and slow muscle atrophy. *Biomed Res*, **2017**; 38(6): 331-342.
9. **Zanou N., Gailly P.** Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci*, **2013**; 70(21): 4117-30.
10. **Glass D. J.** PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol*, **2010**; 346: 267-78.
11. **Tang L., Li N., Jian W., Kang Y., Yin B., Sun S., Guo J., Sun L., Ta D.** Low-intensity pulsed ultrasound prevents muscle atrophy induced by type 1 diabetes in rats. *Skelet Muscle*, **2017**; 7(1): 29.
12. **Huang J., Zhu X.** The molecular mechanisms of calpains action on skeletal muscle atrophy. *Physiol Res*, **2016**; 65(4): 547-560.

13. **Ito N., Takeda S. i.** Role of Ca²⁺ signaling in skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, **2015**; 4(2): 171-176.
14. **Herasse M., Ono Y., Fougerousse F., Kimura E., Stockholm D., Beley C., Montarras D., Pinset C., Sorimachi H., Suzuki K., Beckmann J. S., Richard I.** Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol Cell Biol*, **1999**; 19(6): 4047-55.
15. **Richter E. A., Hargreaves M.** Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev*, **2013**; 93(3): 993-1017.
16. **Tastekin B., Pelit A., Polat S., Tuli A., Sencar L., Alparslan M. M., Daglioglu Y. K.** Therapeutic Potential of Pterostilbene and Resveratrol on Biomechanic, Biochemical, and Histological Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2018**; 2018: 9012352.
17. **Chiu C. Y., Yang R. S., Sheu M. L., Chan D. C., Yang T. H., Tsai K. S., Chiang C. K., Liu S. H.** Advanced glycation end-products induce skeletal muscle atrophy and dysfunction in diabetic mice via a RAGE-mediated, AMPK-down-regulated, Akt pathway. *J Pathol*, **2016**; 238(3): 470-82.
18. **Pelit A., Emre M., Dagli K., Tuli A.** The impact of magnesium on isometric twitch parameters and resting membrane potential of the skeletal muscle in diabetic rats. *Cell Biochem Biophys*, **2013**; 65(3): 315-9.
19. **Andersen H., Gadeberg P. C., Brock B., Jakobsen J.** Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *Diabetologia*, **1997**; 40(9): 1062-9.
20. **Diabetes Control Complications Trial Research Group. Nathan D. M., Genuth S., Lachin J., Cleary P., Crofford O., Davis M., Rand L., Siebert C.** The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, **1993**; 329(14): 977-86.
21. **Hurley B. F., Hanson E. D., Sheaff A. K.** Strength training as a countermeasure to aging muscle and chronic disease. *Sports Med*, **2011**; 41(4): 289-306.
22. **Kraschnewski J. L., Sciamanna C. N., Poger J. M., Rovniak L. S., Lehman E. B., Cooper A. B., Ballentine N. H., Ciccolo J. T.** Is strength training associated with mortality benefits? A 15year cohort study of US older adults. *Prev Med*, **2016**; 87: 121-127.
23. **Booth F. W., Gordon S. E., Carlson C. J., Hamilton M. T.** Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J Appl Physiol* (1985), **2000**; 88(2): 774-87.

24. **Morley J. E., Baumgartner R. N., Roubenoff R., Mayer J., Nair K. S.** Sarcopenia. *J Lab Clin Med*, **2001**; 137(4): 231-43.
25. **de Ferranti S. D., de Boer I. H., Fonseca V., Fox C. S., Golden S. H., Lavie C. J., Magge S. N., Marx N., McGuire D. K., Orchard T. J., Zinman B., Eckel R. H.** Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*, **2014**; 130(13): 1110-30.
26. **van Belle T. L., Coppieters K. T., von Herrath M. G.** Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*, **2011**; 91(1): 79-118.
27. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, **2014**; 37(Supplement 1): S81-S90.
28. **Gillett M. J.** International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes: *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334. *Clin Biochem Rev*, **2009**; 30(4): 197-200.
29. **Dinççağ N., Celik S., Idiz C., Tütüncü Y., Yıldız S. Ö., Satman I.** Awareness of Diabetes and Obesity in Turkey. *Turkish Journal of Endocrinology & Metabolism*, **2017**; 21(2).
30. **Bingley P. J.** Clinical applications of diabetes antibody testing. *J Clin Endocrinol Metab*, **2010**; 95(1): 25-33.
31. **Ziegler A. G., Nepom G. T.** Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*, **2010**; 32(4): 468-78.
32. **Ziegler A. G., Bonifacio E., Group B.-B. S.** Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*, **2012**; 55(7): 1937-43.
33. **Schechter R., Reutrakul S.** Management of Severe Insulin Resistance in Patients with Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*, **2015**; 15(10): 77.
34. **Teupe B., Bergis K.** Epidemiological evidence for "double diabetes". *Lancet*, **1991**; 337(8737): 361-2.
35. **Gordon-Dseagu V. L., Shelton N., Mindell J. S.** Epidemiological evidence of a relationship between type-1 diabetes mellitus and cancer: a review of the existing literature. *Int J Cancer*, **2013**; 132(3): 501-8.
36. **Tuomi T.** Type 1 and type 2 diabetes: what do they have in common? *Diabetes*, **2005**; 54 Suppl 2: S40-5.
37. **Goldman L., Schafger A., Goldman L., Schafger A.** Approach to medicine, the patient, and the medical profession. *Goldman's Cecil medicine*. 24th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2011**.

38. **Group D. P.** Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med*, **2006**; 23(8): 857-66.
39. **Patterson C. C., Dahlquist G. G., Gyurus E., Green A., Soltesz G., Group E. S.** Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*, **2009**; 373(9680): 2027-33.
40. **Greenbaum C. J.** Insulin resistance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, **2002**; 18(3): 192-200.
41. **Coleman S. K., Rebalka I. A., D'Souza D. M., Hawke T. J.** Skeletal muscle as a therapeutic target for delaying type 1 diabetic complications. *World J Diabetes*, **2015**; 6(17): 1323-36.
42. **Krause M. P., Riddell M. C., Hawke T. J.** Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatr Diabetes*, **2011**; 12(4 Pt 1): 345-64.
43. **Fritzsche K., Bluher M., Schering S., Buchwalow I. B., Kern M., Linke A., Oberbach A., Adams V., Punkt K.** Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibers are altered in patients with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **2008**; 116(10): 606-13.
44. **Reske-Nielsen E., Harmsen A., Vorre P.** Ultrastructure of muscle biopsies in recent, short-term and long-term juvenile diabetes. *Acta Neurol Scand*, **1977**; 55(5): 345-62.
45. **von Maltzahn J., Chang N. C., Bentzinger C. F., Rudnicki M. A.** Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol*, **2012**; 22(11): 602-9.
46. **Borello U., Berarducci B., Murphy P., Bajard L., Buffa V., Piccolo S., Buckingham M., Cossu G.** The Wnt/beta-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Development*, **2006**; 133(18): 3723-32.
47. **Sadler T. W.** Langman's medical embryology. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. **2006**; Vol. 333.
48. **Hall J. E., Hall M. E.** Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book. Elsevier Health Sciences. **2020**.
49. **Carlson B. M.** Human Embryology and Developmental biology E-book. Elsevier Health Sciences. **2018**.
50. **Ji S., Losinski R. L., Cornelius S. G., Frank G. R., Willis G. M., Gerrard D. E., Depreux F. F., Spurlock M. E.** Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am J Physiol*, **1998**; 275(4): R1265-73.
51. **Carnac G., Vernus B., Bonnieu A.** Myostatin in the pathophysiology of skeletal muscle. *Curr Genomics*, **2007**; 8(7): 415-22.

52. **Rowley DI, Einhorn TA., O'Keefe RJ., Buckwater JA.** Orthopaedic basic science, foundations of clinical practice **2008**: 465.
53. **Sweeney H. L., Hammers D. W.** Muscle Contraction. Cold Spring Harb Perspect Biol, **2018**; 10(2).
54. **Hidaka S., Okamoto Y., Uchiyama S., Nakatsuma A., Hashimoto K., Ohnishi S. T., Yamaguchi M.** Royal jelly prevents osteoporosis in rats: beneficial effects in ovariectomy model and in bone tissue culture model. Evid Based Complement Alternat Med, **2006**; 3(3): 339-48.
55. **Scott W., Stevens J., Binder–Macleod S. A.** Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. Physical Therapy, **2001**; 81(11): 1810-1816.
56. **Armstrong R. B., Phelps R. O.** Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. Am J Anat, **1984**; 171(3): 259-72.
57. **Head S. I., Arber M. B.** An active learning mammalian skeletal muscle lab demonstrating contractile and kinetic properties of fast- and slow-twitch muscle. Adv Physiol Educ, **2013**; 37(4): 405-14.
58. **Hunter R. B., Stevenson E., Koncarevic A., Mitchell-Felton H., Essig D. A., Kandarian S. C.** Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. FASEB J, **2002**; 16(6): 529-38.
59. **Keynes R. D., Aidley D. J., Huang C. L.-H.** Nerve and muscle. Cambridge University Press Cambridge. **2001**.
60. **Klueber K. M., Feczko J. D., Schmidt G., Watkins J. B.** Skeletal muscle in the diabetic mouse: histochemical and morphometric analysis. Anat Rec, **1989**; 225(1): 41-5.
61. **McGuire M., MacDermott M.** The influence of streptozotocin-induced diabetes and the antihyperglycaemic agent metformin on the contractile characteristics and the membrane potential of the rat diaphragm. Exp Physiol, **1998**; 83(4): 481-7.
62. **Powers S. K., Shanely R. A., Coombes J. S., Koesterer T. J., McKenzie M., Van Gammeren D., Cicale M., Dodd S. L.** Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. J Appl Physiol (1985), **2002**; 92(5): 1851-8.
63. **Ganguly P. K., Mathur S., Gupta M. P., Beamish R. E., Dhalla N. S.** Calcium pump activity of sarcoplasmic reticulum in diabetic rat skeletal muscle. Am J Physiol, **1986**; 251(5 Pt 1): E515-23.
64. **Andersen H., Gjerstad M. D., Jakobsen J.** Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. Diabetes Care, **2004**; 27(10): 2382-5.

65. **Andersen H., Schmitz O., Nielsen S.** Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med*, **2005**; 22(10): 1401-7.
66. **Andersen H., Poulsen P. L., Mogensen C. E., Jakobsen J.** Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. *Diabetes*, **1996**; 45(4): 440-5.
67. **Cotter M., Cameron N. E., Lean D. R., Robertson S.** Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles. *Q J Exp Physiol*, **1989**; 74(1): 65-74.
68. **Cotter M. A., Cameron N. E., Robertson S., Ewing I.** Polyol pathway-related skeletal muscle contractile and morphological abnormalities in diabetic rats. *Exp Physiol*, **1993**; 78(2): 139-55.
69. **Armstrong R. B., Gollnick P. D., Ianuzzo C. D.** Histochemical properties of skeletal muscle fibers in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tissue Res*, **1975**; 162(3): 387-94.
70. **Clueber K. M., Feczko J. D.** Ultrastructural, histochemical, and morphometric analysis of skeletal muscle in a murine model of type I diabetes. *Anat Rec*, **1994**; 239(1): 18-34.
71. **Medina-Sanchez M., Rodriguez-Sanchez C., Vega-Alvarez J. A., Menedez-Pelaez A., Perez-Casas A.** Proximal skeletal muscle alterations in streptozotocin-diabetic rats: a histochemical and morphometric analysis. *Am J Anat*, **1991**; 191(1): 48-56.
72. **Krause M. P., Moradi J., Nissar A. A., Riddell M. C., Hawke T. J.** Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 restores skeletal muscle regeneration in untreated type 1 diabetic mice. *Diabetes*, **2011**; 60(7): 1964-72.
73. **Chen Y., Cao L., Ye J., Zhu D.** Upregulation of myostatin gene expression in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice is attenuated by insulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **2009**; 388(1): 112-6.
74. **McGuire M., Dumbleton M., MacDermott M., Bradford A.** Contractile and electrical properties of sternohyoid muscle in streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **2001**; 28(3): 184-7.
75. **Gordon C. S., Serino A. S., Krause M. P., Campbell J. E., Cafarelli E., Adegoke O. A., Hawke T. J., Riddell M. C.** Impaired growth and force production in skeletal muscles of young partially pancreatectomized rats: a model of adolescent type 1 diabetic myopathy? *PLoS One*, **2010**; 5(11): e14032.
76. **Bodine S. C.** Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*, **2013**; 45(10): 2200-8.
77. **Nair K. S.** Aging muscle. *Am J Clin Nutr*, **2005**; 81(5): 953-63.

78. **Beckmann R. P., Mizzen L. E., Welch W. J.** Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, **1990**; 248(4957): 850-4.
79. **Stewart C. E., Rittweger J.** Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, **2006**; 6(1): 73-86.
80. **Kimball S. R., Vary T. C., Jefferson L. S.** Regulation of protein synthesis by insulin. *Annu Rev Physiol*, **1994**; 56: 321-48.
81. **Smith O. L., Wong C. Y., Gelfand R. A.** Skeletal muscle proteolysis in rats with acute streptozocin-induced diabetes. *Diabetes*, **1989**; 38(9): 1117-22.
82. **Farrell P. A., Fedele M. J., Hernandez J., Fluckey J. D., Miller J. L., 3rd, Lang C. H., Vary T. C., Kimball S. R., Jefferson L. S.** Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. *J Appl Physiol* (1985), **1999**; 87(3): 1075-82.
83. **Charlton M., Nair K. S.** Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr*, **1998**; 128(2 Suppl): 323S-327S.
84. **Pain V. M., Garlick P. J.** Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem*, **1974**; 249(14): 4510-4.
85. **Godil M. A., Wilson T. A., Garlick P. J., McNurlan M. A.** Effect of insulin with concurrent amino acid infusion on protein metabolism in rapidly growing pubertal children with type 1 diabetes. *Pediatr Res*, **2005**; 58(2): 229-34.
86. **Nair K. S., Ford G. C., Ekberg K., Fernqvist-Forbes E., Wahren J.** Protein dynamics in whole body and in splanchnic and leg tissues in type I diabetic patients. *J Clin Invest*, **1995**; 95(6): 2926-37.
87. **Shen W. H., Boyle D. W., Wisniewski P., Bade A., Liechty E. A.** Insulin and IGF-I stimulate the formation of the eukaryotic initiation factor 4F complex and protein synthesis in C2C12 myotubes independent of availability of external amino acids. *J Endocrinol*, **2005**; 185(2): 275-89.
88. **Glass D. J.** Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**; 37(10): 1974-84.
89. **Krause M. P., Liu Y., Vu V., Chan L., Xu A., Riddell M. C., Sweeney G., Hawke T. J.** Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2008**; 295(1): C203-12.
90. **Aragno M., Mastrocola R., Catalano M. G., Brignardello E., Danni O., Boccuzzi G.** Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. *Diabetes*, **2004**; 53(4): 1082-8.

91. **Russell S. T., Wyke S. M., Tisdale M. J.** Mechanism of induction of muscle protein degradation by angiotensin II. *Cell Signal*, **2006**; 18(7): 1087-96.
92. **Lecker S. H., Jagoe R. T., Gilbert A., Gomes M., Baracos V., Bailey J., Price S. R., Mitch W. E., Goldberg A. L.** Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*, **2004**; 18(1): 39-51.
93. **Ekladous D., Mehdi M. Z., Costa M., Srivastava A. K., Chiasson J. L., Coderre L.** Tissue- and fibre-specific modifications of insulin-signalling molecules in cardiac and skeletal muscle of diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **2008**; 35(8): 971-8.
94. **Lau M. T., Leung P. C.** The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway mediates insulin-like growth factor 1-induced E-cadherin down-regulation and cell proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, **2012**; 326(2): 191-8.
95. **Khanduja K. L., Bhardwaj A., Kaushik G.** Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **2004**; 50(1): 61-5.
96. **Pacher P., Liaudet L., Mabley J. G., Cziraki A., Hasko G., Szabo C.** Beneficial effects of a novel ultrapotent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in murine models of heart failure. *Int J Mol Med*, **2006**; 17(2): 369-75.
97. **Yoon M. S.** mTOR as a Key Regulator in Maintaining Skeletal Muscle Mass. *Front Physiol*, **2017**; 8: 788.
98. **Gai Z., Wang Q., Yang C., Wang L., Deng W., Wu G.** Structural mechanism for the arginine sensing and regulation of CASTOR1 in the mTORC1 signaling pathway. *Cell discovery*, **2016**; 2(1): 1-13.
99. **Gibbs J. B., Marshall M. S.** The ras oncogene--an important regulatory element in lower eucaryotic organisms. *Microbiol Rev*, **1989**; 53(2): 171-85.
100. **Fuentes E. N., Einarsdottir I. E., Paredes R., Hidalgo C., Valdes J. A., Bjornsson B. T., Molina A.** The TORC1/P70S6K and TORC1/4EBP1 signaling pathways have a stronger contribution on skeletal muscle growth than MAPK/ERK in an early vertebrate: Differential involvement of the IGF system and atrogenes. *Gen Comp Endocrinol*, **2015**; 210: 96-106.
101. **Vyas D. R., Spangenburg E. E., Abraha T. W., Childs T. E., Booth F. W.** GSK-3 β negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2002**; 283(2): C545-51.
102. **Eddins M. J., Marblestone J. G., Suresh Kumar K. G., Leach C. A., Sterner D. E., Mattern M. R., Nicholson B.** Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy. *Cell Biochem Biophys*, **2011**; 60(1-2): 113-8.

103. **Hishiya A., Iemura S., Natsume T., Takayama S., Ikeda K., Watanabe K.** A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J*, **2006**; 25(3): 554-64.
104. **Bonaldo P., Sandri M.** Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*, **2013**; 6(1): 25-39.
105. **Dasarathy S., Dodig M., Muc S. M., Kalhan S. C., McCullough A. J.** Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2004**; 287(6): G1124-30.
106. **Zhu J., Li Y., Lu A., Gharaibeh B., Ma J., Kobayashi T., Quintero A. J., Huard J.** Follistatin improves skeletal muscle healing after injury and disease through an interaction with muscle regeneration, angiogenesis, and fibrosis. *Am J Pathol*, **2011**; 179(2): 915-30.
107. **Sepulveda P. V., Lamon S., Hagg A., Thomson R. E., Winbanks C. E., Qian H., Bruce C. R., Russell A. P., Gregorevic P.** Evaluation of follistatin as a therapeutic in models of skeletal muscle atrophy associated with denervation and tenotomy. *Scientific reports*, **2015**; 5: 17535.
108. **Reid M. B., Li Y. P.** Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res*, **2001**; 2(5): 269-72.
109. **Frier B. C., Noble E. G., Locke M.** Diabetes-induced atrophy is associated with a muscle-specific alteration in NF- κ B activation and expression. *Cell Stress Chaperones*, **2008**; 13(3): 287-96.
110. **van Dam E. M., Govers R., James D. E.** Akt Activation Is Required at a Late Stage of Insulin-Induced GLUT4 Translocation to the Plasma Membrane. *Molecular Endocrinology*, **2005**; 19(4): 1067-1077.
111. **Miinea C. P., Sano H., Kane S., Sano E., Fukuda M., Peranen J., Lane W. S., Lienhard G. E.** AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J*, **2005**; 391(Pt 1): 87-93.
112. **Carmichael R. E., Wilkinson K. A., Craig T. J.** Insulin-dependent GLUT4 trafficking is not regulated by protein SUMOylation in L6 myocytes. *Sci Rep*, **2019**; 9(1): 6477.
113. **Bhattacharya D., Mukhopadhyay M., Bhattacharyya M., Karmakar P.** Is autophagy associated with diabetes mellitus and its complications? A review. *EXCLI J*, **2018**; 17: 709-720.
114. **Zhao J., Brault J. J., Schild A., Cao P., Sandri M., Schiaffino S., Lecker S. H., Goldberg A. L.** FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*, **2007**; 6(6): 472-83.

115. **Sala D., Ivanova S., Plana N., Ribas V., Duran J., Bach D., Turkseven S., Laville M., Vidal H., Karczewska-Kupczewska M., Kowalska I., Strackowski M., Testar X., Palacin M., Sandri M., Serrano A. L., Zorzano A.** Autophagy-regulating TP53INP2 mediates muscle wasting and is repressed in diabetes. *J Clin Invest*, **2014**; 124(5): 1914-27.
116. **Sala D., Zorzano A.** Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **2015**; 72(20): 3803-3817.
117. **Lecker S. H., Solomon V., Mitch W. E., Goldberg A. L.** Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, **1999**; 129(1S Suppl): 227S-237S.
118. **van Lunteren E., Moyer M.** Streptozotocin-diabetes alters action potentials in rat diaphragm. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **2003**; 135(1): 9-16.
119. **Gentili M., Mazoit J. X., Bouaziz H., Fletcher D., Casper R. F., Benhamou D., Savouret J. F.** Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sci*, **2001**; 68(11): 1317-21.
120. **Torres-Lopez J. E., Ortiz M. I., Castaneda-Hernandez G., Alonso-Lopez R., Asomoza-Espinosa R., Granados-Soto V.** Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci*, **2002**; 70(14): 1669-76.
121. **Granados-Soto V., Argüelles C. F., Ortiz M. I.** The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacology*, **2002**; 43(5): 917-923.
122. **Baur J. A., Sinclair D. A.** Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, **2006**; 5(6): 493-506.
123. **Chan E. W. C., Wong C. W., Tan Y. H., Foo J. P. Y., Wong S. K., Chan H. T.** Resveratrol and pterostilbene: a comparative overview of their chemistry, biosynthesis, plant sources, and pharmacological properties. *J Appl Pharm Sci*, **2019**; 9(7): 124-129.
124. **Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M.** Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*, **1997**; 30(2): 91-113.
125. **Vitaglione P., Sforza S., Galaverna G., Ghidini C., Caporaso N., Vescovi P. P., Fogliano V., Marchelli R.** Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res*, **2005**; 49(5): 495-504.
126. **Bertelli A. A., Giovannini L., Stradi R., Urien S., Tillement J. P., Bertelli A.** Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp Clin Res*, **1998**; 24(1): 51-5.

127. **Walle T., Hsieh F., DeLegge M. H., Oatis J. E., Jr., Walle U. K.** High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, **2004**; 32(12): 1377-82.
128. **Albani D., Polito L., Signorini A., Forloni G.** Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *Biofactors*, **2010**; 36(5): 370-6.
129. **Liu C., Shi Z., Fan L., Zhang C., Wang K., Wang B.** Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. *Brain Res*, **2011**; 1374: 100-9.
130. **de la Lastra C. A., Villegas I.** Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, **2007**; 35(Pt 5): 1156-60.
131. **Lu F., Zahid M., Wang C., Saeed M., Cavalieri E. L., Rogan E. G.** Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2008**; 1(2): 135-45.
132. **Mukherjee S., Dudley J. I., Das D. K.** Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response*, **2010**; 8(4): 478-500.
133. **Eleawa S. M., Alkhateeb M. A., Alhashem F. H., Bin-Jaliah I., Sakr H. F., Elrefaey H. M., Elkarib A. O., Alessa R. M., Haidara M. A., Shatoor A. S., Khalil M. A.** Resveratrol reverses cadmium chloride-induced testicular damage and subfertility by downregulating p53 and Bax and upregulating gonadotropins and Bcl-2 gene expression. *J Reprod Dev*, **2014**; 60(2): 115-27.
134. **Bisht K., Wagner K. H., Bulmer A. C.** Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*, **2010**; 278(1): 88-100.
135. **Kondratyuk T. P., Park E. J., Marler L. E., Ahn S., Yuan Y., Choi Y., Yu R., van Breemen R. B., Sun B., Hoshino J., Cushman M., Jermihov K. C., Mesecar A. D., Grubbs C. J., Pezzuto J. M.** Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *Mol Nutr Food Res*, **2011**; 55(8): 1249-65.
136. **Estrela J. M., Ortega A., Mena S., Rodriguez M. L., Asensi M.** Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2013**; 50(3): 65-78.
137. **Kapetanovic I. M., Muzzio M., Huang Z., Thompson T. N., McCormick D. L.** Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2011**; 68(3): 593-601.
138. **Brown V. A., Patel K. R., Viskaduraki M., Crowell J. A., Perloff M., Booth T. D., Vasilinin G., Sen A., Schinas A. M., Piccirilli G., Brown K., Steward W. P., Gescher A. J., Brenner D. E.** Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent

- resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res*, **2010**; 70(22): 9003-11.
139. **Williams L. D., Burdock G. A., Edwards J. A., Beck M., Bausch J.** Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol*, **2009**; 47(9): 2170-82.
 140. **Riche D. M., McEwen C. L., Riche K. D., Sherman J. J., Wofford M. R., Deschamp D., Griswold M.** Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. *J Toxicol*, **2013**; 2013: 463595.
 141. **Adly A. A.** Oxidative stress and disease: an updated review. *Res J Immunol*, **2010**; 3(2): 129-45.
 142. **Alosi J. A., McDonald D. E., Schneider J. S., Privette A. R., McFadden D. W.** Pterostilbene inhibits breast cancer in vitro through mitochondrial depolarization and induction of caspase-dependent apoptosis. *J Surg Res*, **2010**; 161(2): 195-201.
 143. **McCormack D., McFadden D.** A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**; 2013: 575482.
 144. **McCormack D. E., Mannal P., McDonald D., Tighe S., Hanson J., McFadden D.** Genomic analysis of pterostilbene predicts its antiproliferative effects against pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J Gastrointest Surg*, **2012**; 16(6): 1136-43.
 145. **Park E. S., Lim Y., Hong J. T., Yoo H. S., Lee C. K., Pyo M. Y., Yun Y. P.** Pterostilbene, a natural dimethylated analog of resveratrol, inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation by blocking Akt-dependent pathway. *Vascul Pharmacol*, **2010**; 53(1-2): 61-7.
 146. **Kodan A., Kuroda H., Sakai F.** A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**; 99(5): 3335-9.
 147. **Fremont L.** Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, **2000**; 66(8): 663-73.
 148. **Remsberg C. M., Yanez J. A., Ohgami Y., Vega-Villa K. R., Rimando A. M., Davies N. M.** Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother Res*, **2008**; 22(2): 169-79.
 149. **Meyers B. A.** Pemf-the Fifth Element of Health: Learn Why Pulsed Electromagnetic Field (Pemf) Therapy Supercharges Your Health Like Nothing Else! : BalboaPress. **2013**.
 150. **Williams E. R.** The Schumann resonance: A global tropical thermometer. *Science*, **1992**; 256(5060): 1184-1187.

151. **Tudor M., Tudor L., Tudor K. I.** Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography. *Acta medica Croatica: casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, **2005**; 59(4): 307-313.
152. Cool C. A. T., Health stimulation devices with variable low-voltage tuners and optional temperature control. 2017, Google Patents.
153. **Markov M.** Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future. *The Environmentalist*, **2007**; 27: 465-475.
154. **Markov M. S.** "Biological windows": a tribute to W. Ross Adey. *Environmentalist*, **2005**; 25(2-4): 67-74.
155. **Watson T.** *Electrotherapy E-Book: evidence-based practice*. Elsevier Health Sciences. **2008**.
156. **Markov M. S.** Effects of electromagnetic fields on biological systems. *Electromagn Biol Med*, **2013**; 32(2): 121-2.
157. **Markov M. S.** Magnetic field therapy: a review. *Electromagn Biol Med*, **2007**; 26(1): 1-23.
158. **Markov M. S.** Expanding use of pulsed electromagnetic field therapies. *Electromagn Biol Med*, **2007**; 26(3): 257-74.
159. **Ross C. L., Harrison B. S.** The use of magnetic field for the reduction of inflammation: a review of the history and therapeutic results. *Altern Ther Health Med*, **2013**; 19(2): 47-54.
160. **Musaev A. V., Guseinova S. G., Imamverdieva S. S.** The use of pulsed electromagnetic fields with complex modulation in the treatment of patients with diabetic polyneuropathy. *Neurosci Behav Physiol*, **2003**; 33(8): 745-52.
161. **Sakurai T., Yoshimoto M., Koyama S., Miyakoshi J.** Exposure to extremely low frequency magnetic fields affects insulin-secreting cells. *Bioelectromagnetics*, **2008**; 29(2): 118-24.
162. **Panagopoulos D. J., Messini N., Karabarbounis A., Philippetis A. L., Margaritis L. H.** A mechanism for action of oscillating electric fields on cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**; 272(3): 634-40.
163. **Laitl-Kobierska A., Cieslar G., Sieron A., Grzybek H.** Influence of alternating extremely low frequency ELF magnetic field on structure and function of pancreas in rats. *Bioelectromagnetics*, **2002**; 23(1): 49-58.
164. **Weintraub M. I., Cole S. P.** Pulsed magnetic field therapy in refractory neuropathic pain secondary to peripheral neuropathy: electrodiagnostic parameters--pilot study. *Neurorehabil Neural Repair*, **2004**; 18(1): 42-6.
165. **Eglen R. M., Hunter J. C., Dray A.** Ions in the fire: recent ion-channel research and approaches to pain therapy. *Trends Pharmacol Sci*, **1999**; 20(8): 337-42.

166. **Waxman S. G., Cummins T. R., Dib-Hajj S. D., Black J. A.** Voltage-gated sodium channels and the molecular pathogenesis of pain: a review. *J Rehabil Res Dev*, **2000**; 37(5): 517-28.
167. **Kavak S., Emre M., Meral I., Unlugenc H., Pelit A., Demirkazik A.** Repetitive 50 Hz pulsed electromagnetic field ameliorates the diabetes-induced impairments in the relaxation response of rat thoracic aorta rings. *Int J Radiat Biol*, **2009**; 85(8): 672-9.
168. **Yang J., Sun L., Fan X., Yin B., Kang Y., An S., Tang L.** Pulsed electromagnetic fields alleviate streptozotocin-induced diabetic muscle atrophy. *Mol Med Rep*, **2018**; 18(1): 1127-1133.
169. **Pan Y., Dong Y., Hou W., Ji Z., Zhi K., Yin Z., Wen H., Chen Y.** Effects of PEMF on microcirculation and angiogenesis in a model of acute hindlimb ischemia in diabetic rats. *Bioelectromagnetics*, **2013**; 34(3): 180-8.
170. **Emre M., Cetiner S., Zencir S., Unlukurt I., Kahraman I., Topcu Z.** Oxidative stress and apoptosis in relation to exposure to magnetic field. *Cell Biochem Biophys*, **2011**; 59(2): 71-7.
171. **Gunay I., Mert T.** Pulsed magnetic fields enhance the rate of recovery of damaged nerve excitability. *Bioelectromagnetics*, **2011**; 32(3): 200-8.
172. **Mert T., Gisi G., Celik A., Baran F., Uremis M. M., Gunay I.** Frequency-dependent effects of sequenced pulsed magnetic field on experimental diabetic neuropathy. *Int J Radiat Biol*, **2015**; 91(10): 833-42.
173. **Mert T., Kurt A. H., Altun I., Celik A., Baran F., Gunay I.** Pulsed magnetic field enhances therapeutic efficiency of mesenchymal stem cells in chronic neuropathic pain model. *Bioelectromagnetics*, **2017**; 38(4): 255-264.
174. **Ocal I., Yilmaz M. B., Kocaturk-Sel S., Tufan T., Erkoc M. A., Comertpay G., Oksuz H., Barc E. D.** ATP sensitive K(+) channel subunits (Kir6.1, Kir6.2) are the candidate mediators regulating ameliorating effects of pulsed magnetic field on aortic contractility in diabetic rats. *Bioelectromagnetics*, **2018**; 39(4): 299-311.
175. **Koch L. G., Meredith T. A., Fraker T. D., Metting P. J., Britton S. L.** Heritability of treadmill running endurance in rats. *Am J Physiol*, **1998**; 275(5): R1455-60.
176. **Copp S. W., Davis R. T., Poole D. C., Musch T. I.** Reproducibility of endurance capacity and VO₂peak in male Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol* (1985), **2009**; 106(4): 1072-8.
177. **Leinonen H., Matikainen E., Juntunen J.** Permeability and morphology of skeletal muscle capillaries in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, **1982**; 22(3): 158-162.

178. **Kivela R., Silvennoinen M., Touvra A. M., Lehti T. M., Kainulainen H., Vihko V.** Effects of experimental type 1 diabetes and exercise training on angiogenic gene expression and capillarization in skeletal muscle. *FASEB J*, **2006**; 20(9): 1570-2.
179. **Huttunen N. P., Kaar M. L., Knip M., Mustonen A., Puukka R., Akerblom H. K.** Physical fitness of children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Res*, **1984**; 16(1): 1-5.
180. **Poortmans J. R., Saerens P., Edelman R., Vertongen F., Dorchy H.** Influence of the degree of metabolic control on physical fitness in type I diabetic adolescents. *Int J Sports Med*, **1986**; 7(4): 232-5.
181. **Almeida S., Riddell M. C., Cafarelli E.** Slower conduction velocity and motor unit discharge frequency are associated with muscle fatigue during isometric exercise in type 1 diabetes mellitus. *Muscle Nerve*, **2008**; 37(2): 231-40.
182. **Gulati A. K., Swamy M. S.** Regeneration of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec*, **1991**; 229(3): 298-304.
183. **Talesara C. L., Vashishta N.** Regenerative ability of gastrocnemius muscle under diabetic condition with special reference to SDH & m-ATPase. *Indian J Exp Biol*, **2000**; 38(6): 567-74.
184. **Vignaud A., Ramond F., Hourde C., Keller A., Butler-Browne G., Ferry A.** Diabetes provides an unfavorable environment for muscle mass and function after muscle injury in mice. *Pathobiology*, **2007**; 74(5): 291-300.
185. **Krause M. P., Al-Sajee D., D'Souza D. M., Rebalka I. A., Moradi J., Riddell M. C., Hawke T. J.** Impaired macrophage and satellite cell infiltration occurs in a muscle-specific fashion following injury in diabetic skeletal muscle. *PLoS One*, **2013**; 8(8): e70971.
186. **Manickam M., Ramanathan M., Jahromi M. A., Chansouria J. P., Ray A. B.** Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *J Nat Prod*, **1997**; 60(6): 609-10.
187. **Kelleher A. R., Fairchild T. J., Keslacy S.** STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF-kappaB canonical cascade activation. *Acta Diabetol*, **2010**; 47(4): 315-23.
188. **Jakobsen J., Reske-Nielsen E.** Diffuse muscle fiber atrophy in newly diagnosed diabetes. *Clin Neuropathol*, **1986**; 5(2): 73-7.
189. **Ozmen O., Topsakal S., Haligur M., Aydogan A., Dincoglu D.** Effects of Caffeine and Lycopene in Experimentally Induced Diabetes Mellitus. *Pancreas*, **2016**; 45(4): 579-83.

190. **Tamaddonfard E., Farshid A. A., Asri-Rezaee S., Javadi S., Khosravi V., Rahman B., Mirfakhraee Z.** Crocin improved learning and memory impairments in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iran J Basic Med Sci*, **2013**; 16(1): 91-100.
191. **Caliskan H., Akat F., Tatar Y., Zaloglu N., Dursun A. D., Bastug M., Ficicilar H.** Effects of exercise training on anxiety in diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, **2019**; 376: 112084.
192. **Barclay C. J., Weber C. L.** Slow skeletal muscles of the mouse have greater initial efficiency than fast muscles but the same net efficiency. *J Physiol*, **2004**; 559(Pt 2): 519-33.
193. **Moran A. L., Warren G. L., Lowe D. A.** Soleus and EDL muscle contractility across the lifespan of female C57BL/6 mice. *Exp Gerontol*, **2005**; 40(12): 966-75.
194. **Frayse B., Guicheney P., Bitoun M.** Calcium homeostasis alterations in a mouse model of the Dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Biol Open*, **2016**; 5(11): 1691-1696.
195. **Alamdari N., Aversa Z., Castellero E., Gurav A., Petkova V., Tizio S., Hasselgren P. O.** Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, **2012**; 417(1): 528-33.
196. **Wang D. T., Yin Y., Yang Y. J., Lv P. J., Shi Y., Lu L., Wei L. B.** Resveratrol prevents TNF-alpha-induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. *Int Immunopharmacol*, **2014**; 19(2): 206-13.
197. **Wyke S. M., Tisdale M. J.** Induction of protein degradation in skeletal muscle by a phorbol ester involves upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Life Sci*, **2006**; 78(25): 2898-910.
198. **Wyke S. M., Russell S. T., Tisdale M. J.** Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer*, **2004**; 91(9): 1742-50.
199. **Dvorakova M., Landa P.** Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacol Res*, **2017**; 124: 126-145.
200. **McCormack D., McFadden D.** Pterostilbene and cancer: current review. *J Surg Res*, **2012**; 173(2): e53-61.
201. **Wang P., Sang S.** Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *Biofactors*, **2018**; 44(1): 16-25.
202. **Asensi M., Medina I., Ortega A., Carretero J., Bano M. C., Obrador E., Estrela J. M.** Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med*, **2002**; 33(3): 387-98.

203. **Nutakul W., Sobers H. S., Qiu P., Dong P., Decker E. A., McClements D. J., Xiao H.** Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *J Agric Food Chem*, **2011**; 59(20): 10964-70.
204. **Ono T., Takada S., Kinugawa S., Tsutsui H.** Curcumin ameliorates skeletal muscle atrophy in type 1 diabetic mice by inhibiting protein ubiquitination. *Exp Physiol*, **2015**; 100(9): 1052-63.
205. **Kursvietiene L., Staneviciene I., Mongirdiene A., Bernatoniene J.** Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas)*, **2016**; 52(3): 148-55.
206. **Erdogan C. S., Vang O.** Challenges in Analyzing the Biological Effects of Resveratrol. *Nutrients*, **2016**; 8(6).
207. **Nirwane A., Majumdar A.** Resveratrol and pterostilbene ameliorate the metabolic derangements associated with smokeless tobacco in estrogen deficient female rats. *Journal of functional foods*, **2016**; 23: 261-277.
208. **Vallianou N. G., Evangelopoulos A., Kazazis C.** Resveratrol and diabetes. *Rev Diabet Stud*, **2013**; 10(4): 236-42.
209. **Markov M. S., Colbert A. P.** Magnetic and electromagnetic field therapy. *J Back Musculoskelet Rehabil*, **2000**; 15(1): 17-29.
210. **Li F., Lei T., Xie K., Wu X., Tang C., Jiang M., Liu J., Luo E., Shen G.** Effects of extremely low frequency pulsed magnetic fields on diabetic nephropathy in streptozotocin-treated rats. *Biomed Eng Online*, **2016**; 15: 8.
211. **Girit O. B., Keser H., Severcan F., Bilgin M. D.** Protective Effects of Extremely Low Frequency Magnetic Field (50 Hz, 1 mT) and Pterostilbene Treatment on Renal ischemic Injury. *Biophysical Journal*, **2017**; 112(3): 280a.
212. **Dagdeviren S., Kandilci H. B., Uysal B., Zeybek N. D., Korkusuz P., Gumusel B., Korkusuz F.** Tumor necrosis factor-alpha antagonist administration recovers skeletal muscle dysfunction in ovariectomized rats. *J Orthop Res*, **2011**; 29(2): 275-80.
213. **Mert T., Gunay I., Daglioglu Y. K.** Role of potassium channels in the frequency-dependent activity of regenerating nerves. *Pharmacology*, **2004**; 72(3): 157-66.
214. **Wang D., Sun H., Song G., Yang Y., Zou X., Han P., Li S.** Resveratrol Improves Muscle Atrophy by Modulating Mitochondrial Quality Control in STZ-Induced Diabetic Mice. *Mol Nutr Food Res*, **2018**; 62(9): e1700941.
215. **Wang H., Yang Y. J., Qian H. Y., Zhang Q., Xu H., Li J. J.** Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? *Heart Fail Rev*, **2012**; 17(3): 437-48.

216. **Samir S. M., Abbas A. M., Safwat S. M., Elserougy H. G.** Effect of L-carnitine on diabetes-induced changes of skeletal muscles in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, **2018**; 29(1): 47-59.
217. **Metti S., Gambarotto L., Chrisam M., Baraldo M., Braghetta P., Blaauw B., Bonaldo P.** The Polyphenol Pterostilbene Ameliorates the Myopathic Phenotype of Collagen VI Deficient Mice via Autophagy Induction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **2020**; 8(997).

