

Pemberian Dosis Tinggi D-galactose Jangka Pendek secara Intraperitoneal untuk Menginduksi Proses *Aging* pada Tikus Jantan

Kartika, R.W.^{1,2*}, Sidharta, V.M.², Djuartina, T.², Sartika, C.R.³, Timotius, K.H.¹, Rika, I.¹

¹Faculty of Medicine and Health Sciences, Krida Wacana Christian University, Jakarta

²School of Medicine and Health Sciences, Atma Jaya Catholic University of Indonesia, Jakarta

³ PT Prodia StemCell Indonesia (ProSTEM).

*corresponding author: ronald.kartika@ukrida.ac.id

Abstrak

Pendahuluan: Injeksi D-galaktosa (D-gal.i.p.) intraperitoneal yang dapat mempercepat penuaan telah digunakan untuk mengembangkan model penuaan. Penelitian sebelumnya menggunakan D-galaktosa jangka panjang selama 4 minggu untuk menginduksi penuaan pada mencit menimbulkan kesulitan waktu dan biaya pengobatan. Para peneliti sedang mencoba mencari tahu apakah pemberian D-gal dosis tinggi dalam jangka pendek. aku p. pada tikus mampu menginduksi tanda-tanda signifikan yang mirip dengan penuaan alami, yaitu peningkatan stres oksidatif dan myostatin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jalur penuaan otot pada tikus akibat pemberian D-galaktosa dosis tinggi dalam waktu singkat. **Metode:** Rancangan penelitian studi eksperimen, in vivo, dilakukan di laboratorium terpadu FKIK Universitas Katolik Atma Jaya Jakarta menggunakan 22 ekor tikus Sprague Dawley, jantan, umur 6-12 minggu, berat 200-350 gram. Sebelas ekor tikus diinduksi intraperitoneal (G-ip) D-galaktosa 300 mg/kg/hari selama 7 hari. 11 ekor tikus sisanya diinduksi dengan NaCl 0,9% i.p (N-ip). Pada penelitian ini pengukuran berat badan, lingkaran gastrocnemius, CRP dan kadar myostatin blood elisa dibandingkan antara hari ke 7 dan hari ke 0 untuk melihat efek sistemik injeksi D. Galaktosa. Data dianalisis menggunakan SPSS versi 20. **Hasil:** Pemberian D-gal jangka pendek. i.p secara signifikan meningkatkan peradangan sistemik. dan tingkat myostatin. Pada kelompok perlakuan terjadi peningkatan aktivitas superoksida dismutase meskipun lebih rendah dibandingkan NaCl 0,9% i.p. kelompok. **Kesimpulan:** Dosis Tinggi Waktu singkat D-gal. injeksi mungkin membuat penuaan alami yang dapat berkembang pada tikus paling cepat satu minggu.

Kata Kunci : Intra Peritoneal D-Galactosa, stres oksidatif, superoksida dismutase, peradangan.

Abstract

Introduction: Intraperitoneal injection of D-galactose (D-gal.i.p.) can accelerate aging has been used to develop a model of aging. Previous research using long-term D-galactose for 4 weeks to induce aging in mice raises difficulties in time and treatment costs. Researchers are trying to find out if giving high doses of D-gal short-term. i.p. in mice was able to induce significant signs similar to natural aging, namely increased oxidative stress and myostatin. The aim of this study was to find out the pathways of muscle aging in rats as a result of administration of high dose short time D-galactosa. **Methods:** The research design of an experimental study, in vivo, was carried out in the integrated laboratory of FKIK Atma Jaya Catholic University Jakarta using 22 Sprague Dawley rats, male, aged 6-12 weeks, 200-350 grams. Eleven rats were induced intraperitoneal (G-ip) D-galactose 300 mg/kg/day for 7 days. the remaining 11 rats were induced by NaCl 0.9% i.p (N-ip). In this study, measurements of body weight, gastrocnemius circumference, CRP and myostatin blood elisa levels were compared between day 7 and day 0 to see the systemic effect of D. Galactose injection. Data were analyzed using SPSS version 20. **Result:** Short term administration of D-gal. i.p significantly increased systemic inflammation and myostatin level. In treatment groups, there was an increased superoxide dismutase activity although it was lower compared to the NaCl 0.9% i.p. group. **Summary:** Hight Dose Short time D-gal. injection might make natural aging that can develop in mice as early as one week.

Keyword : *Intra Peritoneal D-Galactosa, stress oxidative , superoxide dismutase, inflammation .*

I. PENDAHULUAN

Banyak metode yang telah digunakan dalam penelitian hewan percobaan untuk menginduksi penuaan dini, salah satunya menggunakan D-Galaktosa (D-gal.) yang merupakan gula pereduksi. Pada konsentrasi normal D-gal dimetabolisme menjadi glukosa tetapi pada dosis tinggi dapat diubah menjadi aldosa dan hidro peroksida. melalui aksi galaktosa oksidase yang menghasilkan pembentukan anion superoksida dan turunan oksigen sebagai radikal bebas.¹

Induksi kronis D-gal. dapat menyebabkan penurunan kognitif dan motorik yang merupakan gejala penuaan, oleh karena itu dianggap sebagai model percepatan penuaan. Namun patomekanisme D-galaktosa yang menginduksi proses penuaan otot masih belum jelas. Selama ini penggunaan D-galaktosa biasanya dalam waktu 4-6 minggu dengan dosis 60-150 mg/kg berat badan. Kekurangan induksi kronis D-gal dengan dosis tersebut memerlukan waktu penelitian yang lama sehingga meningkatkan biaya penelitian.^{2,3} Penggunaan D-galaktosa dosis tinggi dalam waktu singkat belum diketahui efeknya terhadap penuaan otot.

II. METODE

Penelitian ini menggunakan desain studi eksperimen *in vivo* yang dilakukan di Laboratorium Terpadu FKIK Universitas Katolik Atma Jaya Jakarta. Penelitian ini menggunakan 22 ekor tikus Sprague Dawley jantan dengan rentang usia 6-12 minggu dan berat 200-350 gram. Sebelas ekor tikus diinduksi intraperitoneal (G-IP) dengan D-galaktosa sebanyak 300 mg/kg/hari selama 7 hari, sementara 11 ekor tikus sisanya diinduksi dengan NaCl 0,9% intraperitoneal (N-IP). Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran berat badan, lingkaran gastrocnemius, pengukuran kadar CRP dan myostatin dengan metode elisa pada hari ke-0 dan hari ke-7 untuk melihat efek sistemik

dari injeksi D-galaktosa. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS versi 20.

III. HASIL

A. KARAKTERISTIK SUBYEK PENELITIAN

Dari 28 mencit dalam penelitian, enam mencit termasuk dalam kriteria eksklusi karena 1 mencit mati, dan 5 mencit mengalami lisis sampel darah, sehingga total yang digunakan adalah 22 mencit. Dari 22 mencit dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan D-Galaktosa i.p dan NaCl ip (kontrol). Setiap kelompok dilakukan pengukuran berat badan (BB) dan lingkaran otot Gastrocnemius (LOG) pada hari ke-0 sebagai data awal. Data BB mencit dan LOG pada hari ke-0, tidak ditemukan perbedaan bermakna. (Tabel 1)

TABEL 1. DATA AWAL BERAT BADAN DAN LINGKAR OTOT GASTROCNEMEUS PADA TIAP KELOMPOK SEBELUM INTERVENSI (HARI KE-0)

Group	B.B (gram)	p	Lingkaran Otot Gastrocnemius (cm)	
			Right	Left
D-Galactosa	265 ± 35,6	0,734	4,2± 0,3	4,2± 0,325
i.p NaCl	264,5± 42,8		4,1± 0,5	4,1± 0,4

Data mean (SD), *Independent t-test*

B.W= Body Weight

B. PERUBAHAN BERAT BADAN DAN LINGKAR OTOT GASTROCNEMEUS PADA TIAP KELOMPOK SETELAH INTERVENSI (HARI KE-7)

Pada hari ke-7, kelompok yang mendapat induksi D-Galaktosa i.p dengan dosis 300 mg/kg/waktu selama 7 hari berturut-turut mengalami penurunan berat badan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok yang mendapat NaCl 0,9% i.p sesuai Tabel 2

TABEL 2. PERUBAHAN BERAT BADAN PADA TIAP KELOMPOK SETELAH INTERVENSI (HARI KE-7) DIBANDINGKAN HARI KE-0

	BB (gram) Day-0	BB (gram) Day-7	Δ B.W Day 7-0	p
D-Galaktosa i.p (n=11)	264,4± 20,5	236,5± 18,5	-27,3± -2,0	0,049*
NaCl ip (n=11)	0.9% 264,1± 31,2	267,4± 45,2	3,3± 13,5	0,975

Data mean (SD), independent t-test

Analisis pada hari ke-7 tidak ada perubahan signifikan pada diameter otot Gastrocnemius setelah mendapatkan D-galaktosa i.p. Perlakuan dibandingkan dengan NaCl 0,9% i.p. menurut Tabel 3.

TABEL 3. PERUBAHAN BERAT BADAN PADA TIAP KELOMPOK SETELAH INTERVENSI (HARI KE-7) DIBANDINGKAN HARI KE-0

	Lingkar Otot Gastrocne meus	D- galaktos a i.p (n=11)	NaCl 0.9% ip (n=11)	p value
Hari ke-0	Kanan	4,0±0,3	4,1±0,5	0,313
	Kiri	4,1±0,3	4,1±0,5	0,325
Hari ke -7	Kanan	4,2±0,3	4,2±0,7	0,303
	Kiri	4,3±0,4	4,2±0,7	0,591

Data mean (SD), independent t-test

C. PERBEDAAN KADAR CRP DAN MYOSTATIN PADA HEWAN PERCOBAAN SETELAH INDUKSI PERLAKUAN GALAKTOSA HARI KE-7

Pada analisis stres oksidatif didapatkan bahwa kelompok yang mendapat induksi D-galaktosa i.p, mengalami peningkatan CRP dibandingkan kelompok NaCl 0,9% secara signifikan, $p = 0,044$. Analisis perubahan penanda myostatin, pada kelompok yang mendapat pengobatan D-galaktosa i.p mengalami peningkatan Myostatin yang signifikan dibandingkan dengan NaCl.ip 0,9%, $p=0,049$ sesuai Tabel 4.

TABEL 4. PERUBAHAN KADAR SOD DAN MYOSTATIN PADA SETIAP KELOMPOK

	Hari ke-0	Hari ke-7 H7- H0	Δ	Nilai p
CRP	D-galactose	1.47 ± 0.55	1.71 ±	0.3± 0.2 0.041*
	i.p.		0.56	-0.3 ±
	NaCl 0.9 %	1.38 ± 0.42	1.06 ±	0.8
Myost atin	i.p		0.86	
	D-galactose	904,04±	1008,38	104,34± 0,028*
	i.p.	179,01	± 208,13	18,7
NaCl 0.9 %	i.p	1080,51±	1125,66	45,15±
		145,28	± 136,81	14,6

Data mean (SD) , Independent t-test

IV. DISKUSI

A. PENGARUH INDUKSI D-GALAKTOSA I.P DIBANDINGKAN DENGAN NACL I.P TERHADAP PERUBAHAN BERAT BADAN

Hasil penelitian ini menunjukkan kelompok tikus jantan yang mendapat induksi D-galaktosa i.p dengan dosis 300 mg/kg/hari i.p selama 7 hari mengalami penurunan berat badan yang signifikan setelah hari ke-7 penyuntikan ($p=0,049$). Hal ini sesuai dengan penelitian Fatemi et.al., yang melaporkan bahwa mencit yang diinduksi D-galaktosa dengan dosis 500 mg/kg/BB memberikan efek penurunan berat badan. Penurunan berat badan setelah pemberian D-galaktosa dosis besar disebabkan oleh peningkatan hidrasi (peningkatan asupan minum karena peningkatan rasa haus) yang akan menyebabkan penurunan berat badan karena penurunan asupan makanan, dan hilangnya lemak, melalui peningkatan lipolisis.^{7,8}

Menurut Thornton et al, pada hewan pengerat, D-galaktosa dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada berbagai jaringan dan organ karena paparan sistemik D-galaktosa mempercepat proses penuaan biokimia dan morfologi termasuk sistem saraf pusat.^{8,9} Kerusakan pada sistem saraf pusat akan mempengaruhi sistem saraf pusat. renin-angiotensin sentral atau perifer. Situasi ini akan menyebabkan peningkatan respons minum dan penurunan berat badan. Ini terkait antara hipohidrasi kronis

(dehidrasi ekstra seluler) dan peningkatan kadar hormon angiotensin II. Selanjutnya, angiotensin II akan merangsang pelepasan hormon antidiuretik (ADH), sekresi aldosteron dan rasa haus.⁹

Penurunan berat badan pada mencit yang diinduksi D-galaktosa dengan dosis 300 mg/kg/hari selama 7 hari diduga karena peningkatan ROS yang akan memicu aktivitas Superoksida Dismutase (SOD), sehingga terjadi penurunan hormon ghrelin. Penurunan hormon ghrelin akan menyebabkan penurunan nafsu makan, sehingga asupan makanan pada tikus akan berkurang.^{9,10}

Berbeda dengan penelitian Zhao et al, mencit yang diberi D-galaktosa dengan dosis 80 mg/kg/minggu selama 8 minggu memberikan efek penambahan berat badan, mirip dengan penelitian Chen et al., pada mencit yang diberi D-galaktosa dari 150 mg/kg/berat badan selama 8 minggu juga menghasilkan kenaikan berat badan. Perbedaan hasil ini disebabkan perbedaan dosis D-galaktosa yang diberikan (dosis kecil selama 8 minggu).^{11,12}

Penelitian dari Azman K.F, nilai rata-rata variabel massa otot tungkai pada kelompok tikus yang diberi D-galaktosa 100 mg/kg/hari selama 8 minggu menurun menjadi 0,50 g, sedangkan dengan dosis 150/kg/hari selama 8 minggu cenderung menurun. menurun lagi yaitu sebesar 0,45 g.¹³

B. PENGARUH INDUKSI D-GALAKTOSA I.P DIBANDINGKAN DENGAN NaCl I.P TERHADAP PERUBAHAN KADAR CRP SEBAGAI MARKER INFLAMASI

Analisis biomarker inflamasi pada model tikus percobaan setelah diberikan D-galaktosa 300 mg/kg/hari selama 7 hari menunjukkan peningkatan inflamasi yang ditandai dengan peningkatan Δ CRP yang signifikan pada kelompok yang mendapatkan induksi D-galaktosa (0,3+ 0,2 pg/ul)

dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diinduksi NaCl 0,9 i.p (-0,3 + 0,8) secara signifikan ($p = 0,041$). Hal ini terjadi karena akumulasi glukosa dalam tubuh yang mengakibatkan peningkatan peradangan. Protein atau lemak yang bergabung dengan gula dalam aliran darah akan menghasilkan Advanced Glycation End Products (AGEs) yang dapat menyebabkan stres oksidatif dan peradangan.¹⁴

D-galaktosa dapat menyebabkan mutasi pada DNA mitokondria, penurunan enzim untuk perbaikan DNA, akan mengakibatkan gangguan mitokondria yang memicu penuaan. Paparan D-galaktosa juga menyebabkan penurunan enzim antioksidan seperti glutathione, katalase, superoksida dismutase yang dapat meningkatkan stres oksidatif. D-galaktosa dioksidasi oleh galaktosa oksidase menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang menyebabkan penurunan superoksida dismutase (SOD), sedangkan H_2O_2 bereaksi dengan besi tereduksi dan membentuk ion hidroksida (OH^-)/radikal bebas. Stres oksidatif akan menurunkan sintesis ATP yang dapat merusak membran mitokondria, merusak struktur mitokondria dan akhirnya menginduksi apoptosis.^{18,19}

Penelitian ini menunjukkan bahwa NaCl 0,9% i.p dapat berfungsi sebagai antioksidan untuk mengurangi efek radikal bebas akibat paparan D-galaktosa i.p. Joane et al melaporkan bahwa NaCl dapat mengkatalisis 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil. Zat NaCl juga berfungsi sebagai anti oksidan dan menetralkan efek anion superoksida. Efek lain dari NaCl adalah katalisis oksidasi lemak (oksidasi lipid).^{20,21}

Injeksi D-Galaktosa juga meningkatkan peradangan yang menyebabkan peningkatan stres oksidatif juga. Hal ini terjadi karena akumulasi glukosa dalam tubuh yang mengakibatkan peningkatan peradangan. Protein atau lemak yang bergabung dengan gula dalam aliran darah akan menghasilkan

Advanced Glycation End Products (AGEs) yang dapat menyebabkan stres oksidatif dan peradangan.¹⁴

Petrushev et al, tikus yang diberi larutan D-galaktosa 100 mg/kg per oral selama 42 hari akan terjadi peningkatan 8-iso-PGF (2 α), IL-6, TNF- α dalam plasma yang merupakan tanda peningkatan penanda inflamasi. Sejalan dengan penelitian Azman K.F, pemberian 100 mg/kg/hari D-galaktosa dan 150 mg/kg/hari D-galaktosa terbukti meningkatkan kadar IL-6, 150 mg/kg/hari D-galaktosa administrasi meningkat kadar IL-6 bahkan lebih tinggi.¹³

D-galaktosa mengaktifkan jalur ekstrinsik dan intrinsik dari apoptosis. D-galaktosa juga memicu mitokondria untuk melepaskan cyt c, menurunkan level ekspresi Bcl2 anti-apoptosis dan meningkatkan Bax apoptosis. Proses apoptosis akan memicu peradangan saraf dan degenerasi saraf. Dosis D-galaktosa untuk memulai menginduksi apoptosis adalah 100 mg-500 mg/kg/hari, dengan durasi 6 sampai 9 minggu.¹⁶

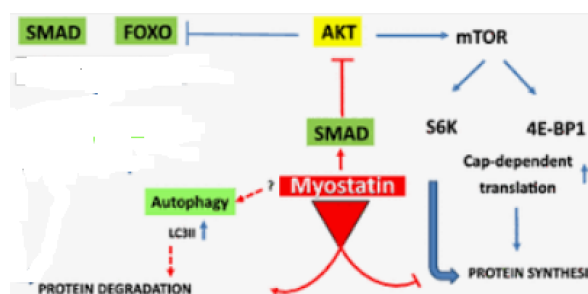
Jadi hiperglikemia memiliki efek berbahaya pada sel dan sistem organ karena dapat mempengaruhi sistem kekebalan tubuh dan bertindak sebagai mediator inflamasi. Hiperglikemia menyebabkan sekresi sitokin proinflamasi sehingga memicu inflamasi sistemik serta stres oksidasi.¹⁷

C. PENGARUH INDUKSI D-GALAKTOSA I.P DIBANDINGKAN DENGAN NaCl I.P TERHADAP PERUBAHAN KADAR MYOSTATIN

Penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol yang mendapat D-galaktosa i.p terjadi peningkatan Δ Myostatin yang signifikan (88,8+ 18,7 pg/ul) dibandingkan dengan kelompok yang mendapat NaCl 0,9% (-121,3 + 34,6 pg/ul) dengan p = 0,049.

Myostatin, anggota dari transforming growth factor- β (TGF- β) berfungsi sebagai penghambat autokrin pertumbuhan otot rangka, menginduksi atrofi serat otot dengan mengaktifkan Smad2 dan Smad3 dan menekan sintesis protein dengan menghambat protein kinase B (Akt).²²

Peningkatan myostatin ekspresi memainkan peran sentral dalam mengintegrasikan/memediasi respons anabolik dan katabolik. Myostatin secara negatif mengatur aktivitas jalur Akt, yang mendorong sintesis protein, dan meningkatkan aktivitas sistem ubiquitin-proteasome untuk menginduksi atrofi. Selain itu, myostatin berfungsi sebagai modulator jalur katabolik utama, termasuk sistem ubiquitin-proteasome dan autophagy-lysosome. Dengan demikian, jalur myostatin menghambat pertumbuhan otot melalui (1) regulasi silang antara myostatin, jalur pemacu pertumbuhan dan sistem proteolitik; (2) penghambatan myostatin menyebabkan hipertrofi otot; dan (3) regulasi translasi oleh myostatin (Gambar 1).^{23, 24}



GAMBAR 1. MYOSTATIN FUNCTION AS MODULATOR ANABOLIC AND KATABOLIC PATHWAY.²⁶

Peningkatan Myostatin Protein akibat pemberian D-galaktosa akan menimbulkan resiko atrofi otot walaupun pada penelitian ini belum terjadi perubahan diameter otot gastrocnemeus. D-galaktosa baru mulai berlaku pada minggu ke-4.²⁶

VI. Kesimpulan

Pemberian D-galaktosa dosis tinggi dalam waktu singkat pada hewan model tikus dapat menginduksi penuaan otot yang ditandai

dengan peningkatan inflamasi dan kadar Myostatin. Hal ini didukung dengan penurunan berat badan yang merupakan tanda dari proses penuaan

Pengakuan

Studi ini digunakan sebagai bagian pendidikan di Magister Biomedik Universitas Katolik Atma Jaya, Jakarta, Indonesia.

Konflik kepentingan

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

Informasi Pendanaan

Hal ini dimungkinkan sebagian melalui sponsor dan dukungan keuangan dari LPPM Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta, Universitas Katolik LPPM Atma Jaya, Jakarta dan PT Prodia Stemcell Indonesia (Prostem).

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. J. Lexell, C.C. Taylor, M. Sjöström, What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men, *J Neurol Sci*, 1988; 84 (2) :275-294
- [2]. I. Rosenberg Symposium: sarcopenia: diagnosis and mechanisms *J Nutr*, 1997; 127 : 990- 991
- [3]. C. Beaudart, M. Zaaria, F. Pasleau, J.Y. Reginster, O. Bruyere Health outcomes of sarcopenia: a systematic review and meta-analysis *PloS One*, 2017; 12 (1): 12-18
- [4]. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scoble H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):667-84.
- [5]. Carnac G, Vernus B, Bonniou A. Myostatin in the pathophysiology of skeletal muscle. *Curr Genomics*. 2007 Nov;8(7):415-22.
- [6]. Han HQ, Mitch WE. Targeting the myostatin signaling pathway to treat muscle wasting diseases. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2011 Dec;5(4):334-41.
- [7]. A. Rebbapragada, H. Benchabane, J. L. Wrana, A. J. Celeste, L. Attisano, Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor β -Like Signaling Pathway To Block Adipogenesis, *Mol Cell Biol*. 2003 Oct; 23(20): 7230–7242
- [8]. Fatemi, I. et.al. Protective effect of metformin on D-galactose-induced aging model in mice, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2018;21(1),19–25.
- [9]. Thornton, S. N. Increased Hydration Can Be Associated with Weight Loss, *Frontiers in Nutrition*, 2016;3: 1–8. McPherron, A. C., Lawler, A. M., and Lee, S. J.. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997, 387, 83–90
- [10]. Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K. G., Somers, W. G., Devlin, G. P., Conaglen, J. V., et al.. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Physiol*. 1999, 180, 1–9.
- [11]. Zhao, H. et.al. Antioxidant effects of compound walnut oil capsule in mice aging model induced by D-galactose, *Food and Nutrition Research*,2018; 62:1–10.
- [12]. Chen, P., Chen, F. and Zhou, B. Leonurine ameliorates Dgalactose-induced aging in mice through activation of the Nrf2 signalling pathway, *Aging Albany NY*. 2019; 11(18):1–8
- [13]. Azman, K.F. dan Zakaria, R. Dgalactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*. 2019;20 (6):763- 782.
- [14]. Bashir H, Ahmad Bhat S, Majid S, Hamid R, Koul RK, Rehman MU, Din I, Ahmad Bhat J, Qadir J, Masood A. Role of inflammatory mediators (TNF- α , IL-6, CRP), biochemical and hematological parameters in type 2 diabetes mellitus patients of Kashmir, India. *Med J Islam Repub Iran*. 2020; 12:34–38.
- [15]. Konermann, S. 2019. Oxidative stress biomarkers of brain damage: hyperacute plasma f2-isoprostane predicts infarct growth in stroke. *Physiology & Behavior*. 173(3)(1):665–676
- [16]. Ji, M., Su, X., Liu, J., Zhao, Y., Li, Z., Xu, X., Nashun, B. Comparison of naturally aging and D-galactose induced aging model in beagle dogs. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017; 14(6), 5881– 5888.
- [17]. Mohammadi, E., Mehri, S., Bostan, H. B., & Hosseinzadeh, H. (2018). Protective effect of crocin against d-galactose-induced aging in mice. *Avicenna J Phytomed*. 8(1), 14–23.
- [18]. Legiawati L. The Role of Oxidative Stress, Inflammation, and Advanced Glycation End Product in Skin Manifestations of Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2022;18(3):1-6
- [19]. Hadzi-Petrushev N, Stojkovski V, Mitrov D, Mladenov M. D-galactose induced inflammation lipid peroxidation and platelet activation in rats. *Cytokine*. 2014;69(1):150–153
- [20]. Shwe T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Exp Gerontol*. 2018 Jan;101:13-36

- [21]. Consitt LA, Clark BC. The Vicious Cycle of Myostatin Signaling in Sarcopenic Obesity: Myostatin Role in Skeletal Muscle Growth, Insulin Signaling and Implications for Clinical Trials. *J Frailty Aging*. 2018;7(1):21-27
- [22]. Attie KM, Borgstein NG, Yang Y, Condon CH, Wilson DM, Pearsall AE, Kumar R, Willins DA, Seehra JS, Sherman ML: A single ascending-dose study of muscle regulator ACE-031 in healthy volunteers. *Muscle Nerve* 2013;47:416-423
- [23]. Wilkes JJ, Lloyd DJ, Gekakis N: Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor- α production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. *Diabetes* 2009;58:1133-1143.
- [24]. Tu P, Bhasin S, Hruz PW, Herbst KL, Castellani LW, Hua N, Hamilton JA, Guo W: Genetic disruption of myostatin reduces the development of proatherogenic dyslipidemia and atherogenic lesions in Ldlr null mice. *Diabetes* 2009;58:1739-1748.
- [25]. El Shafey, N., Guesnon, M., Simon, F., Deprez, E., Cosette, J., Stockholm, D., et al. (2016). Inhibition of the myostatin/Smad signaling pathway by short decorin-derived peptides. *Exp. Cell Res*. 341, 187–195.
- [26]. Busquets S, Toledo M, Orpí M, Massa D, Porta M, Capdevila E, Padilla N, Frailis V, López-Soriano FJ, Han HQ, Argilés JM. Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012 Mar;3(1):37-43.
- [27]. Anggraini, D., & Putra, I. A. (2022). Imunopatogenesis Karsinoma Hepatoselular. *Scientific Journal*, 1(4), 318-324.