



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA KRONİK METABOLİK ASİDOZ VE OVEREKTOMİ  
MODELİNİN KEMİK DOKU ÜZERİNE ETKİSİ

YUNUS EMRE KABAN

Haziran 2022  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA KRONİK METABOLİK ASİDOZ VE OVEREKTOMİ  
MODELİNİN KEMİK DOKU ÜZERİNE ETKİSİ**

**ANATOMİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yunus Emre KABAN**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR**

**Denizli, 2022**

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Yunus Emre KABAN

İmza:

## ÖZET

### SIÇANLARDA KRONİK METABOLİK ASİDOZ VE OVEREKTOMİ MODELİNİN KEMİK DOKU ÜZERİNE ETKİSİ

Yunus Emre KABAN

Yüksek Lisans Tezi, Anatomi AD.

Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR

Haziran 2022, 64 Sayfa

Kronik Metabolik Asidoz (KMA) kronik diyare hastalığı, aşırı ilaç kullanımı ve ketojenik diyetler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu durum vücuttaki pH seviyesinin düşmesi ve  $\text{HCO}_3^-$  seviyesinin azalmasıyla ortaya çıkan ve asit-baz bozukluğuna sebep olan metabolik bir klinik tablodur. Overektomi (OVX) ise postmenapozal dönemde meydana gelen özellikle kemik hasarı ve osteoporoz ile karakterize bir durumdur. OVX'in kemik doku üzerine yapmış olduğu negatif etki yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Fakat KMA'nın kemik doku üzerinde yapmış olduğu etki üzerine çalışmalar sınırlıdır. Bizim amacımız, KMA'nın kemik doku üzerinde meydana getirdiği hasarı ortaya koymak ve OVX'in vermiş olduğu hasar ile karşılaştırmaktır. Bu çalışma ile; yapılan diğer çalışmalara ek olarak yapacağımız değerlendirmeler ve yöntemler, KMA'nın kemik doku üzerindeki etkisine geniş bir bakış açısı ile bakmaktadır. Bu amaçla 60 adet Sprague Dawley cinsi yetişkin dişi sıçanlar alınıp, Kontrol (KONT), Sahte operasyon (SHAM), Overektomi (OVX), Kronik Metabolik Asidoz (KMA) ve Overektomi+Kronik Metabolik Asidoz (OVX-KMA) grupları oluşturuldu. Deneyden önce OVX grubunda bulunan hayvanlara overektomi cerrahisi uygulanırken KMA grubu hayvanlara 10 hafta boyunca gavaj yoluyla günde iki kez 15 mEq/kg dozunda  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (amonyum klorür) verildi. Tüm sıçanların ağırlıkları düzenli şekilde ölçüldü, 10. haftanın sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek kan gazı analizi ve biyokimyasal testler için arteriyel kan alındı. RT-PCR, mikro-BT, biyomekanik testler, Raman spektroskopisi ölçümleri için femur ve tibia kemikleri diseke edildi. İstatistiksel analiz (ANOVA) kullanılarak tüm gruplar karşılaştırıldı. KMA'ya maruz kalan kemik dokuda yapılan Raman spektroskopisi analizleri sonucu mineral ve organik matriks oranlarında azalma, RT-PCR deneyleri ile kemik yapımından sorumlu proteinlerinde azalma ile yıkımından sorumlu proteinlerinde artış meydana geldi. Mikro-BT ve biyomekanik testler sonucunda mikro mimari ve makro yapıda hasar görüldü ( $p<0.005$ ). Sonuç olarak KMA kemik dokuda fiziko-kimyasal, mikro ve makro yapıda hasara sebep olmaktadır. Bu çalışma, KMA'nın kemik dokuda hasara sebep olduğunu bütüncül bir bakış açısıyla ortaya koymaktadır. Bu konuda yapılacak klinik çalışmalara ve tedavi çalışmalarına önemli bir kaynak olacaktır.

26 Haziran

**Anahtar kelimeler:** Kronik Metabolik Asidoz, Overektomi, Kemik, Osteoporoz

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2020SABE030).**

**ABSTRACT****EFFECT OF CHRONIC METABOLIC ACIDOSIS AND OVARIECTOMY MODEL ON BONE TISSUE IN RATS**

Yunus Emre KABAN

Master Thesis in Anatomy

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR (MD. PhD)

June 2022, 64 Pages

Chronic Metabolic Acidosis (CMA) occurs as a result of chronic diarrheal disease, excessive drug use and ketagenic diets. This is a metabolic clinical state that occurs when the pH level in the body decreases and the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> level decreases and causes acid-base disorder. Ovariectomy (OVX) is a condition that occurs in the postmenopausal period, especially characterized by bone damage and osteoporosis. The negative effect of OVX on bone tissue has been demonstrated by studies. However, studies on the effect of KMA on bone tissue are limited. Our aim is to reveal the damage caused by CMA on the bone tissue and compare it with the damage caused by OVX. The aim of this study is to reveal the effect of CMA on bone tissue with a broad perspective, with the evaluations and methods we will do in addition to other studies. For this purpose, 60 Sprague Dawley adult female rats were taken and Control (CONT), Sham Operation (SHAM), Ovariectomy (OVX), Chronic Metabolic Acidosis (CMA) and Ovariectomy+Chronic Metabolic Acidosis (OVX-CMA) groups were formed. Before the experiment, the animals in the OVX group underwent ovariectomy surgery, while the animals in the CMA group were given NH<sub>4</sub>Cl (ammonium chloride) at a dose of 15 mEq/kg twice a day by gavage for 10 weeks. Weights of all rats were measured regularly. At the end of the 10th week, the rats were sacrificed and arterial blood was collected for blood gas analysis and biochemical tests. Femur and tibia bones were dissected for RT-PCR, micro-CT, biomechanical tests, Raman spectroscopy measurements. All groups were compared using statistical analysis (ANOVA). As a result of Raman spectroscopy analysis, a decrease in mineral and organic matrix ratios, a decrease in proteins responsible for bone formation and an increase in proteins responsible for destruction occurred with RT-PCR experiments. Micro-architecture and macro structure were damaged as a result of micro-CT and biomechanical tests (p<0.005). As a result, CMA causes physico-chemical, micro and macro structure damage in bone tissue. This study demonstrates from a holistic perspective that CMA causes damage to bone tissue. It will be an important resource for clinical studies and treatment studies on this subject.

26 Haziran

**Keywords:** Chronic Metabolic Acidosis, Ovariectomy, Bone, Osteoporosis**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 2020SABE030)**

## TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime katkı sağlayan ve tezimin hazırlanması sürecinde değerli katkılarıyla ve emekleriyle yardımını esirgemeyen ve beni yönlendiren kıymetli hocam ve tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR hocama,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana sağladıkları katkılarından dolayı Anatomi Anabilim Dalındaki değerli Hocalarım Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL'e, Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR'e, Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER'e ve Doç. Dr. Özgür Barış DÖNMEZ'e

Asistanlığımın başlangıcından bugüne kadar beraber çalışmış olduğum tüm asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarımıza,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını eksik etmeyen Danış AYGÜN, Nuriye KURBETLİ, Fikri TÜRK, Gül NEŞET, İbrahim CÜNEYİT, Şevval ÖZTÜRK'e

Bugünlere gelmemde büyük emeği geçen aileme,

Desteğini her daim hissettiğim, varlığıyla bana güç veren Gizem ÖZGÜR'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Yunus Emre KABAN

# İÇİNDEKİLER

Sayfa	
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Amaç.....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....</b>	<b>4</b>
2.1. Kemik Dokunun Genel Özellikleri.....	4
2.2. Kemik Doku Yapım ve Yıkımı.....	6
2.3. Osteoporoz ve Kemik Doku İlişkisi.....	10
2.4. Deneysel Osteoporoz Modeli.....	10
2.5. Metabolik Asidoz ve Kemik Doku İlişkisi .....	11
2.6. Kronik Metabolik Asidoz Modeli.....	12
2.7. Hipotez.....	13
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>14</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	14
3.2. Overektomi Modelinin Oluşturulması.....	15
3.3. Kronik Metabolik Asidoz Modelinin Oluşturulması .....	16
3.4. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi, Dokuların Alınması.....	16

3.5. Kemik Dokudan RT-PCR Deneyleri.....	17
3.6. Mikro-BT Görüntülemeleri ve Analizleri.....	17
3.7. Biyomekanik Testler (Üç Nokta Eğme Testi).....	19
3.8. Raman Spektroskopi Analizi.....	20
3.9. Total Antioksidan Seviyesi- Total Oksidan Seviyesi Ölçümleri.....	20
3.10. Serum Osteokalsin ve Serum Alkalen Fosfataz Ölçümü.....	21
3.11. İstatistiksel Yöntemler.....	21
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>23</b>
4.1. Ağırlık Ölçümü Bulguları.....	23
4.2. Kan Gazı Ölçümü Bulguları.....	25
4.3. Total Antioksidan Seviyesi- Total Oksidan Seviyesi Ölçümü Bulguları .....	26
4.4. Serum Osteokalsin ve Serum Alkalen Fosfataz Ölçümü Bulguları.....	28
4.5. Raman Spektroskopi Ölçümü Bulguları.....	29
4.6. Mikro-BT Görüntülemeleri ve Analizleri Bulguları.....	31
4.7. Biyomekanik Testler (Üç Nokta Eğme Testi) Bulguları.....	34
4.8. RT-PCR Deneyleri Bulguları.....	35
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>37</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>44</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>50</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>51</b>
EK-1 Etik Kurul Kararı.....	51



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1</b> Bir Uzun Kemiğin Genel Yapısı.....	5
<b>Şekil 2.2</b> Osteoklastogenezde RANK, RANKL ve OPG İlişkisi.....	8
<b>Şekil 2.3</b> Kemiğin Yeniden Şekillenmesi .....	9
<b>Şekil 2.4</b> Vücuttan Asit Atılımı Yolları .....	11
<b>Şekil 3.1.</b> Ventral İnsizyon ile Uterusun Takibi ve Overlerin Alımı.....	15
<b>Şekil 3.2</b> Kan Gazı Alımı .....	17
<b>Şekil 3.3</b> İmageJ Programı ile İç ve Dış Çapın Hesaplanması.....	19
<b>Şekil 4.1</b> Ağırlık Ölçümünün Haftalara Göre Gösterilmesi .....	24
<b>Şekil 4.2</b> Ağırlık Ölçümünün Haftalık Değişiminin Gösterilmesi .....	25
<b>Şekil 4.3</b> Kan Gazı Ölçümü Yapılan Grupların pH ve HCO <sub>3</sub> Değerlerinin Gösterilmesi .....	26
<b>Şekil 4.4</b> Total Antioksidan Seviyesi- Total Oksidan Seviyesi ve Oksidatif Stres Seviyesi Değerlerinin Gösterilmesi .....	27
<b>Şekil 4.5</b> Serum Alkalen Fosfataz ve Serum Osteokalsin Değerlerinin Gösterilmesi.....	28
<b>Şekil 4.6</b> Fosfat/Amide1, Fosfat/Amide3, Fosfat/Prolin, Kristalleşme Hidroksiprolin/Prolin, 1670/1640, 1670/1690, 1245/1270 Değerlerinin Gösterilmesi .....	30
<b>Şekil 4.7</b> Yüzde Hacim, Toplam Hacim, Trabeküler Kalınlık, Trabeküler Ayrılma ve Trabeküler Hacim Değerlerinin Gösterilmesi.....	33
<b>Şekil 4.8</b> Eğme Dayanımı Sonuçlarının Gösterilmesi.....	34
<b>Şekil 4.9</b> RT-PCR Deney Sonuçlarının Isı Haritası ile Gösterilmesi.....	36

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 4.1</b> Kan pH ve HCO <sub>3</sub> Değerlerinin Gösterilmesi.....	26

**SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ**

ALPL.....	Alkaleen fosfataz
BAP.....	Kemik alkaleen fosfataz
COX-2.....	Siklooksijenaz
CO <sub>2</sub> .....	Karbondioksit
H.....	Hidrojen
HCO <sub>3</sub> .....	Bikarbonat
IL-1.....	İnterlökin 1
IL-6.....	İnterlökin 6
Kg.....	Kilogram
KCal.....	Kilokalori
KMA.....	Kronik metabolik asidoz
MEPE.....	Matriks ekstraselüler fosfoglikoprotein
M-CSF.....	Monosit koloni uyarıcı faktör
NH <sub>4</sub> Cl.....	Amonyum klorür
OC.....	Osteokalsin
OGR.....	Yumurtalık kanseri G proteini-bağlı reseptör-1
OPG.....	Osteoprotegerin
OVX.....	Overektomi
PGE <sub>2</sub> .....	Prostoglandin E <sub>2</sub>
pH.....	Potansiyel hidrojen
PHEX.....	Fosfat düzenleyici endopeptidaz homolog x-bağlı

PICP.....	Tip I prokollajen C-terminal propeptidi
PINP.....	Tip I prokollajen N-terminal propepti
PTH.....	Paratiroid hormon
RANK.....	Nükleer faktör- $\kappa$ B'nin reseptör aktivatörü
RANKL.....	Nükleer faktör- $\kappa$ B ligandının reseptör aktivatörü
Runx2.....	Runt ile ilgili transkripsiyon faktörü
RT-PCR.....	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
TNF.....	Tümör nekroz faktör
TRAcP .....	Tartarata dirençli asit fosfataz
TAS.....	Total antioksidan seviyesi
TOS.....	Total oksidan seviyesi

## 1. GİRİŞ

Kronik metabolik asidoz (KMA), dünya genelinde kronik diyare hastalığının yaygınlığı sebebiyle en yaygın asit-baz bozukluğu olarak kabul edilir (Pham vd 2015). Kronik metabolik asidoz vücuttaki pH seviyesinde meydana gelen düşüş ve  $\text{HCO}_3^-$  seviyesindeki azalmayla karakterize durumdur (Kraut vd 1986) Vücutta ortaya çıkan asidin vücut dışına atılamaması,  $\text{HCO}_3^-$  ile tamponlanamaması durumlarında ortaya çıkar. Bu durumda kemik doku KMA' nın tamponlanmasında görev alır ve homeostazı sağlar (Gasser vd 2014).

Asidik ortama maruz kalan kemik dokuda fizikokimyasal bir çözünme ortaya çıkar. Bu durum kemik dokudaki sodyum, potasyum, kalsiyum ve fosfat minerallerinde kayba sebep olur. Meydana gelen hücre aracılı olaylar sonucunda hem osteoblastik hem de osteoklastik genlerin ekspresyonunda değişimlere sebep olur. Osteoklastik aktivitede artış ve osteoblastik aktivitede azalmaya bağlı olarak kemiğin yeniden şekillenme evresinde bozulma meydana gelir. Bu bozulma sonucunda kemikte sürekli bir yıkım meydana gelirken kemik yeniden oluşumu ve minerilizasyonu sağlanamaz. Bu sebeplerden dolayı kemik dokunun biyomekanik, histomorfometrik ve fizikokimyasal özellikleri değişip zayıflar ve osteoporotik duruma gelir (Kraut vd 1986, Gasser vd 2014, Pham vd 2015).

Osteoporoz kemik kütlelerinde azalma ve kemik mimarisinde meydana gelen bozulma ile karakterize bir durumdur. Osteoporoz bütün kemiklerde görülür ve sessiz bir hastalıktır. Genellikle vertebra, femur, coxa'da meydana gelen kırıklar ile kendini gösterir. Osteoporoz ikiye ayrılmaktadır. Primer osteoporoz genellikle postmenapozal dönemde meydana gelir. Sekonder osteoporoz ise malign nedenler, endokrin nedenler, metabolik bozukluklar ile karakterizedir (Antoniucci vd 2005, Comelekoglu vd 2007).

Osteoporozu sebep olan durumlar arasında en çok öne çıkan durum postmenapozal dönemdir. Menopoz, vücuttaki östrojen miktarının azalması ve bununla birlikte kemik kütlelerindeki düşüş ile karakterize bir durumdur. Östrojen konsantrasyonunda meydana gelen azalma kemiklerde kalsiyum ve fosfat mineral

birikimini azaltmaktadır. Buna ek olarak kemik matriks miktarı ve osteoblastik aktivite de azalmaktadır. Kemikte meydana gelen bu değişiklikler osteoporoz riskini artırıp ilerleyen dönemlerde kırıklara neden olmaktadır. Literatürde deney hayvanlarında osteoporoz oluşturmak için sıkça kullanılan yöntem overektomi (OVX) yöntemidir (Comelekoglu vd 2007, Donmez vd 2012). Overektomi modeli deney hayvanlarından anestezi altında overlerin alınmasıyla postmenopozal dönemin modellendiği ve çok yaygın olarak kullanıldığı bir yöntemdir. Overektomi işleminden sonra gözlemlenen kemik yapım ve yıkımındaki biyokimyasal ve histomorfometrik değişimler postmenapozal dönemde görülen değişimlerle büyük benzerlik göstermektedir. Bu nedenle deneysel olarak menapoz modeli oluşturmak için overektomi yöntemi yaygın olarak uygulanmaktadır. Overektomi kemiklerin biyomekanik, histomorfometrik ve fiziko-kimyasal özelliklerini değiştirip kemik dokuyu zayıflatarak kırıklara yol açmaktadır (Kalu ve Dike N. 1991, Lauritzen vd 1993, Egermann vd 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kronik metabolik asidozun kemik dokuda meydana getirdiği hasarlar ortaya koyulmuştur. Bu çalışmalarda KMA'nın kemik dokuda kayba sebep olduğu ve kemik oluşumunu bozduğu ve kemik mineralizasyonunu engellediği ortaya koyulmuştur (Kraut vd 1986, Han vd 1998, Assapun vd 2009, Donmez vd 2012, Gasser vd 2014). Ancak KMA ve OVX modellerinin birlikte kullanıldığı ve kemik doku üzerindeki etkilerini ortaya koyan az sayıda çalışma bulunmaktadır (Gasser vd 2014). Gasser ve ark. nın yaptığı çalışmada asidoz ve OVX modelinin uygulandığı deney gruplarında görüntüleme ve biyokimyasal analiz değerlendirmeleri yapılmış ve kemik doku üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Ancak yapılan bu çalışmalar KMA'nın kemik doku üzerindeki hasarın mekanizmasını net bir şekilde açıklayamamaktadır.

Bu bilgilere dayanarak OVX modeli üzerinde KMA'nın etki mekanizmasını daha iyi açıklamak adına literatürdeki çalışmalarda yer alan görüntüleme ve biyokimyasal analizlere ek olarak protein seviyesi ve spektroskopik değerlendirmelerle birlikte bu çalışma planlanmıştır. Yapacağımız bu çalışma ile KMA'nın kemik doku üzerindeki etkisi geniş bir bakış açısı ile değerlendirilmiş ve bu sonuçlar doğrultusunda yapılacak tedavi yöntemlerine bir alt yapı oluşturabileceği düşünülmüştür.

### **1.1 Amaç**

KMA'nın metabolik etkisi daha önceki yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Kemik doku üzerine etkisi gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte bu alanda yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Bu çalışmadaki amacımız KMA'nın kemik doku üzerindeki etkisinin ortaya konması, hasara sebep olan etkilerin açıklanması ile literatüre yeni bir

bakış açısı sağlamak, literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırmak ve katkıda bulunmaktır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Kemik Dokunun Genel Özellikleri

İskeletin temelini oluşturan kemik doku vücudun diğer yapılarını desteklemekte, hayati organları dış etkenlere karşı korumakta ve kan hücrelerinin üretimi için gerekli kemik iliğini barındırmaktadır. İçerisinde barındırdığı mineraller ile vücuttaki mineral homeostazını ve asit-baz dengesini sağlamaktadır (Taichman 2005). Buna ek olarak kalsiyum, fosfat ve diğer minerallerin depo edilmesi ve vücut sıvılarındaki seviyelerinin dengede tutulmasını sağlamaktadır (Florencio-Silva vd 2015).

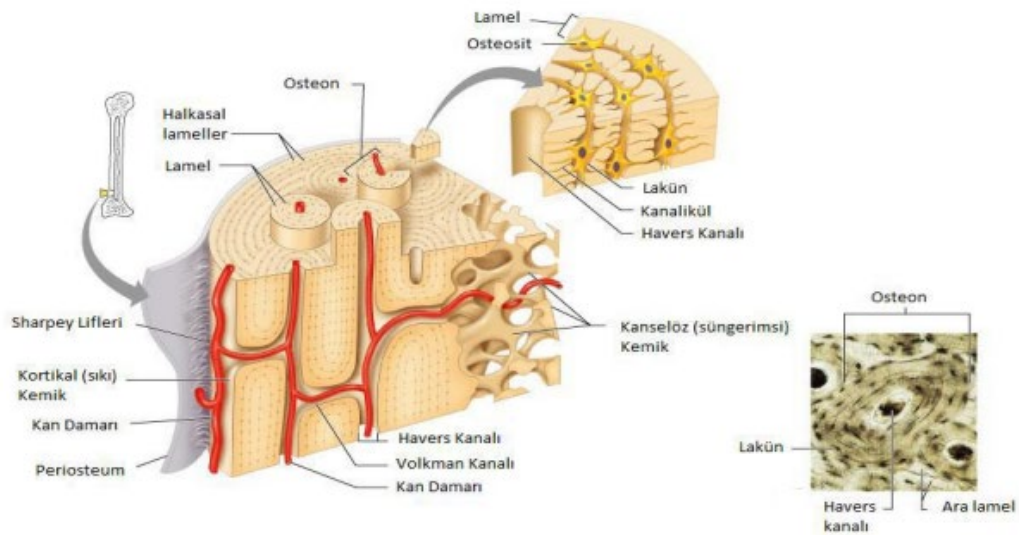
Kemik dokunun matriks bölümü kemik hücrelerinin arasını dolduran ara madde görevi görmektedir. Matris dokusu organik, inorganik maddeler ve sudan meydana gelmekte olup kemik dokunun yaklaşık %30-40'ını organik maddeler oluşturmaktadır. Bu organik maddelerin %95'i kolajen liflerden oluşmaktadır (Clarke 2008). Geriye kalan %60-70'lik kısmını ise inorganik maddeler oluşturmaktadır. Organik maddeler kemik dokuya elastikiyet özelliği kazandırırken inorganik maddeler ise kemiğe sertlik kazandırmaktadır (İnsal ve Pişkin 2017). Kemikte inorganik maddelerde meydana gelebilecek bir kayıp kemiğin şeklinde bir deformiteye sebep olmadığı halde kemikte yumuşamaya sebep olmaktadır (Clarke 2008).

Kemik doku incelendiğinde dış kısımda sert bağ doku ile karakterize periosteum tabakası bulunmaktadır. Dış taraftan kemiği saran bu yapı fibroblastları ve kollajen lifleri içeren fibröz tabakadır. İç tabakada ise fazla miktarda osteoprogenitör hücreler bulunmaktadır. Sharpey lifleri olarak adlandırılan periosteal kollajen lifler kemik matriksi ile periosteum dokusunun bir arada kalmasını sağlamaktadır. Periosteumda yoğun bir ağ bulunmaktadır. Bu ağın içerisinde yoğun miktarda kan ve sinir lifleri bulunmaktadır. (Tümay 2008, Tunçay 2013).

Kemik dokunun içyapısı incelendiğinde iki tabakadan meydana gelmektedir. Bunlar, dış kısımdaki sert tabaka olan substantia compacta ve iç kısımda bulunan süngerimsi kısım olan substantia spongiosa'dır. Substantia compacta'da longitudinal ve



transvers kanallar bulunmaktadır. Longitudinal kanallarda (Havers kanalları) kemik dokunun damarları görülmekte ve bu kapiller damarlar arasında yağ dokusu ve kemik iliği bulunmaktadır. Bu longitudinal kanallar da yanlara doğru uzanmakta olan enine kanallarla (Valkmann) bağlantılıdır ve bu şekilde kemiğin dış yüzeyi ile periosteum arasında bağlantı sağlanmaktadır. Bu kanallar sayesinde kemik dokunun beslenmesi gerçekleşmektedir. Bu kanallar içerisinde osteoblastlar bulunmakta ve bu hücreler daha sonra osteositlere dönüşmektedirler. Substantia spongiosa'da kemik dokuya uygulanan kuvveti ileten lameller yer alır. İç kısmı boşluklu ve süngerimsidir ve yoğun bir şekilde organik maddeler bulundurmaktadır. Substantia compacta'daki gibi longitudinal ve transvers kanallar bulunmadığı için beslenme kemik iliğinden doğrudan sağlanmaktadır (Clarke 2008, Donmez vd 2012, İnsal ve Pişkin 2017).



Şekil 2.1 Bir uzun kemiğin genel yapısı (Tunçay 2013)

Kemik doku yapı olarak sert bir dokudan meydana gelmesine rağmen aynı zamanda da kan damarları içeren canlı bir dokudur. İçerisinde dokunun dengede kalmasını sağlayan farklı hücre çeşitleri bulundurmaktadır. Bu hücreleri osteoprogenitör hücreler, osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlar oluşturmaktadır (Tunçay 2013).

**Osteoprogenitör hücreler:** Şekil olarak fibroblastlara benzeyen ve mezenkim kökenli olan bu hücreler osteoblastlara dönüşebilmektedir. Osteoprogenitör hücreler periosteum, endosteum ve Havers kanallarında bulunmaktadır. Bu hücreler aktifleştğinde kemik oluşumu için osteoblastlara farklılaşmaktadırlar.

**Osteoblastlar:** Kemik yüzeyinde kübik şekilde bulunan ve kemik oluşturma fonksiyonuna sahip hücrelerdir. Sitoplazmalarında bol miktarda alkalin fosfataz bulunmaktadır. Bu yüzden alkalin fosfataz osteoblastlar için önemli bir belirteçdir.

Osteositler: Matriks kanallarında bulunan lakunalar içinde yer alan osteositler metabolik faaliyetleri azalan osteoblastlardan farklılaşırlar. Osteoblastlar gibi osteositlerde bölünme özelliğine sahip olmayan hücrelerdir. Yaşlanıp ölen osteositlerin olduğu yerdeki matrikste bozulmalar meydana gelmektedir ve osteoklastlar tarafından rezorbe edilmektedir. Daha sonra yeniden şekillenme meydana gelmektedir.

Osteoklastlar: Kemik iliğinde bulunan hematopoetik hücreler osteoklastların kökenini oluşturmaktadır. Bu hücreler çok çekirdekli ve mitokondri açısından zengin büyük (100 µm) hücrelerdir. Kemik dokuyu yıkıma uğratan ve rezorbsiyondan sorumlu bu hücreler kandaki monositlerin birleşmesiyle oluşmaktadırlar. Sitoplazmalarında bol miktarda lizozom bulunmaktadır. Hücre dışına sitozomal uzantılar vererek lizozomal enzimleri hücre dışına aktarır ve buralarda Howship Lakunaları denilen çukurlar oluşturmaktadırlar. Bu çukurlar yaşlanan ve hasar gören kemik yüzeylerinde oluşturulur ve osteoblastlar tarafından tekrardan yenilenip şekillendirilmektedir (Roodman ve G. David. 1999, Downey vd 2006).

## 2.2. Kemik Doku Yapım ve Yıkımı

Kemik dokunun büyümesi ve gelişmesi iki şekilde açıklanabilmektedir. Kemiklerin yaşam boyunca fizyolojik etkilere ve biyomekanik kuvvetlere karşı gösterdiği tepki sonucunda şekil değiştirmesi (modeling) ve fetal dönemde kemik oluşumundan başlayıp tüm yaşam boyunca kemik dokunun korunması, oluşabilecek hasarlardan kaynaklanan yapıların uzaklaştırılması, tamir edilip yeniden biçimlenmesi (remodeling) olarak adlandırılmaktadır (İnsal ve Pişkin 2017). Kemik, kemik yapım ve yıkımı olmak üzere iki karşıt süreçle sürekli yeniden şekillenmeye uğrayan aktif bir dokudur. Bu işlemler, osteoklastların (emilim), osteoblastların (oluşum) ve osteositlerin (bakım) aktivitesine dayanmaktadır. Normal koşullar altında, kemik erimesi ve oluşumu birbiri ile sıkı ilişki içindedir; böylece çıkarılan kemik miktarı her zaman yeni oluşan kemik miktarına eşittir. Bu denge, çeşitli sistemik hormonların (ör. PTH, D vitamini, diğer steroid hormonlar) ve lokal araçların (ör. sitokinler, büyüme faktörleri) etkisiyle sağlanır ve düzenlenir. Aksine, büyüme, yaşlanma, kemik hastalıkları, artan veya azalan hareketlilik durumları, terapötik müdahaleler ve diğer birçok durum, kemik döngüsünde belirgin dengesizliklerle karakterizedir. Kemik döngüsündeki bu tür bozulmaların sonuçları genellikle kemik yapısı, gücü ve kütledeki değişikliklerdir (Seibel 2005).

Kemik formasyonunda (oluşum) ve rezorpsiyonunda (yıkım) görevli proteinler ve enzimler vardır. Kemik formasyonunda görevli yapılar osteoblastların gelişim aşamalarındaki ürünlerdir. Bunlar Kemik alkalin fosfataz (BALP), Osteokalsin (OC),

Runt ile ilgili transkripsiyon faktörü (Runx2), Tip I prokollajen C-terminal propeptidi (PICP), Tip I prokollajen N-terminal propepti (PINP)'dir.

Kemiğe özgü olan alkalen fosfataz (BALP) ALP'nin yapısal türlerinden olup osteoblast hücrelerinin fonksiyonu ile ilişkilidir. Kemik alkalen fosfataz, artmış kemik formasyonunun ve osteoblastik aktivitenin önemli bir belirteçidir (van Straalen vd 1991, Tobiume vd 1997).

Osteokalsin osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. 49 aminoasitten oluşmaktadır. Kemikteki tüm proteinin %1'ini oluşturan ve kollojen olmayan bir proteindir. Osteoblastlarca sentezlendikten sonra büyük bir kısmı kemiğin ekstrasellüler matriksine geçerken çok az bir kısmı dolaşıma katılmaktadır (Kargın ve Fidancı 2002). Sentezlenen osteokalsinler kalsiyumları bağlayarak kemik dokuda biriktirmektedir. Bu sebeple osteokalsin kemik formasyonun önemli bir belirteçidir. Runx2 bir transkripsiyon faktörü olup osteoblast farklılaşmasını sağlamaktadır. (Boskey ve Posner 1984, Vasikaran vd 2011).

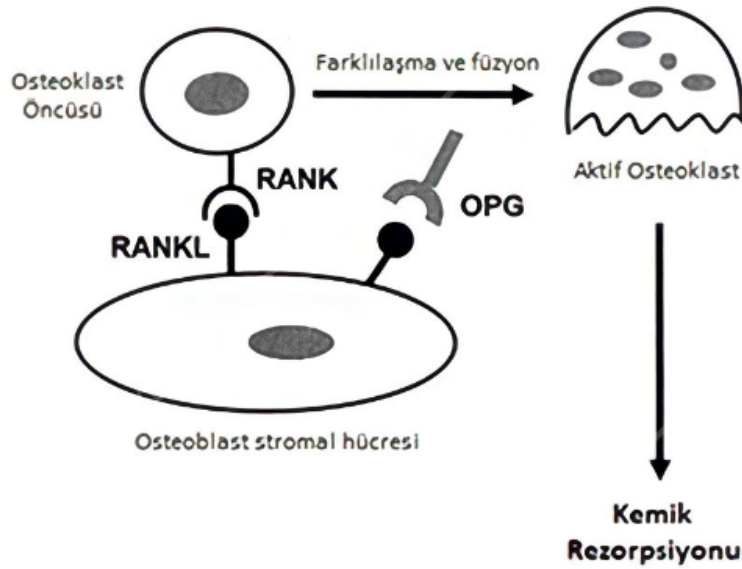
Kemik rezorpsiyonundan sorumlu proteinler ise Nükleer faktörκB ligandının reseptör aktivatörü (RANKL), Nükleer faktör-κB reseptör aktivatörü (RANK), Osteoprotegerin (OPG), Tartarata dirençli asit fosfataz (TRAcP) 5b'dir (Swaminathan 2001).

RANKL, TNF ligandlarının üyesi olan bir proteindir. Osteoblast stromal hücreleri üzerinde sentezlenmektedir. Osteoblastik membran üzerinde bulunmakta ve aktif T hücreleri tarafından uyarılmaktadır ya da sekrete edilmektedir. RANKL artışı kemik dokuda osteoklast sayısını artırmakta ve apoptozun inhibisyonunu sağlamaktadır. Bu durum kemik yıkımını artırmaktadır. Osteoklast sentezini uyaran tüm uyarılar RANKL sentezini de uyarmaktadır (Khosla 2001).

RANK, öncül ve olgun osteoklast üzerinde bulunan transmembran bir proteindir. RANKL'ın osteoklast öncüllerine birleşmesini sağlamaktadır. Osteoklastogenez ve kalsiyum metabolizmasından sorumlu bu reseptör öncül ve olgun osteoklast yüzeylerinde bulunmaktadır. RANKL-RANK kompleksi sonrasında hücre içine alınarak lizozomlarda yıkılmaktadır (Seibel ve Meier 2010).

Tartarata dirençli asit fosfataz (TRACP), osteoklastlar, makrofaj ve dendritik hücreler tarafından yüksek miktarda sentezlenen bir enzimdir. İnsanlarda iki tipi vardır. Bunlar makrofajlardan ve dendritik hücrelerden sentezlenen TRACP 5a ve osteoklastlar tarafından sentezlenen TRACP 5b'dir. (Halleen vd 2006). TRACP 5a vücuttaki enflamatuar durumun bir belirteci iken TRACP 5b ise kemik rezorpsiyonunun en önemli belirteçidir ve kemik rezorpsiyonu sırasında osteoklastlar tarafından sentezlenerek dolaşıma salınmaktadır. Dolaşımdaki tüm TRACP 5b osteoklastlar tarafından üretilmektedir (Janckila vd 2002, Salminen vd 2005).

OPG, tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ailesinin üyesi olan bir polipeptittir. Temel fonksiyonu osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunun inhibisyonudur. OPG serbest RANKL hücrelerini bağlayarak inhibe ederek RANKL hücrelerinin RANK'a bağlanmasını engellemektedir. Bu şekilde osteoklastik aktiviteyi inhibe etmiş olmaktadır (Khosla 2001, Seibel ve Meier 2010). Bu döngü Şekil 2.2.' de gösterilmektedir.



**Şekil 2.2** Osteoklastogenezde RANK, RANKL ve OPG ilişkisi (Tobeiha vd 2020).

Remodeling kavramı fetal dönemde kemik oluşumundan başlayıp tüm yaşam boyunca kemik dokunun korunması, oluşabilecek hasarlardan kaynaklanan yapıların uzaklaştırılması, tamir edilip yeniden biçimlenmesi olarak adlandırılmaktadır (İnsal ve Pişkin 2017) Remodeling döngüsü birbirini izleyen, sakin dönem aktivasyonu, rezorbsiyon, tersine dönme, kemik yapımı ve son bulma şeklinde beş aşamadan meydana gelmektedir. Bu döngü osteoklastların, RANKL, OPG, IL-1, IL-6 ve M-CSF ile uyarılması ile başlamaktadır (Hofbauer vd 2004, Huang vd 2004).

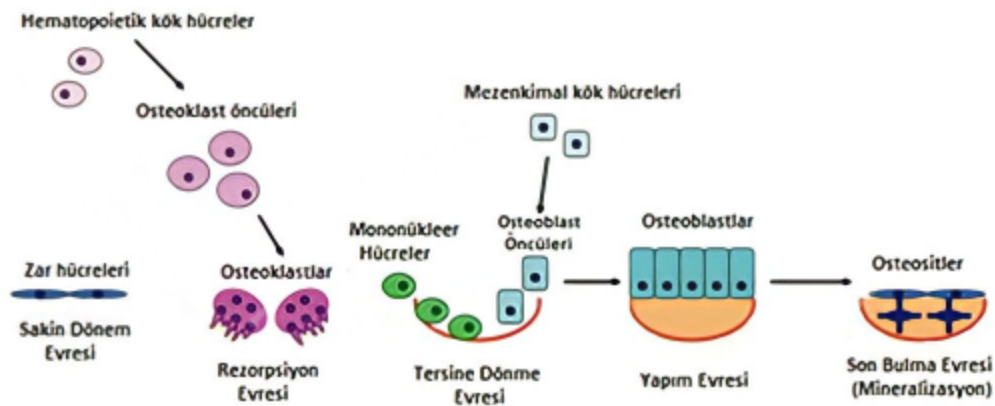
Sakin dönem aktivasyonu evresi kemik yeniden şekillenmesinin ilk aşamasıdır. Bu aşamada kemik iliğinde mevcut olana osteoklast öncülleri dolaşımdan alınıp aktive edilmektedir. Yerel sitokinlerin aktive olması ile osteoklastik aktivite artıp rezorbsiyon evresine geçilmektedir (Bayliss vd 2012).

Rezorbsiyon evresi yerel sitokinler ve hormonal değişimler sonucunda artmış osteoklastik aktivite ile başlamaktadır. Aktive olmuş osteoklastlardaki lizozomal enzimlerin salgılanması ile organik matrikste yıkımlar ve Howship çukurları meydana gelmektedir. Artmış H<sup>+</sup> iyonu salınımına bağlı olarak mineral matrikste de bozulmalar

meydana gelmektedir. Ortaya çıkan Howship lakunalarının yeniden doldurulması için kendi öncül hücrelerinden oluşan osteoblastlar aktive olmaktadır. Aktive olan osteoblastlar ile tersine dönme evresine geçilmektedir.

Tersine dönme evresinde artmış osteoblastik aktivite ile osteoblastlardan osteosit salınımı artıp oluşan çukurlar kapatılmaya çalışılmaktadır. Osteositlerin artması ile kemik yapım evresine girmektedir. Bu evrede osteosit salınımı artıp osteoklastlar apoptozise uğramaktadır. Kemik matriksinde meydana gelen hasarın giderilmesinde rol oynayan osteositler tüm bu aşamalardan sonra mineralizasyon ile kemik doku matriksini normal kemik formuna getirmektedir. Kemğin tamamen şekillendiği bu evre mineralizasyon (son bulma evresi) olarak adlandırılmaktadır (Hadjidakis ve Androulakis 2006)

Özet olarak kemik yeniden şekillenmesi, osteoklastların kemik mineral ve matriks kaybına yol açmasıyla başlamaktadır. Mononükleer hücreler, farklılaştıkça yeni sentezlenen matriks üreten osteoblastlar için emilen yüzeyi hazırlamaktadır. Matriks mineralizasyonu ve bazı osteoblastların osteositlere diferansiyeli yeniden şekillenme döngüsünü tamamlamaktadır (Kapinas vd 2011, Rowe vd 2020). Kararlı durumdaki kemikte osteoblastik aktivite ve osteoklastik aktivite denge halindedir. Bu denge halini bozacak durumlara (hormonlardaki değişiklikler, ilaç kullanımı, asid-baz dengesi bozuklukları) bağlı olarak osteoblast-osteoklast dengesindeki bozukluk kemik kütlesinde artmaya (osteopetroz) veya azalmaya (osteoporoz) sebep olabilmektedir (Kapinas vd 2011, İnsal ve Pişkin 2017, Rowe vd 2020). Normal bir kemik dokudaki kemik doku yeniden şekillenmesi Şekil 2.3.' te gösterilmektedir.



**Şekil 2.3** Kemğin yeniden şekillenmesi (Kapinas ve Delany 2011).

### 2.3. Osteoporoz ve Kemik Doku İlişkisi

Osteoporoz kemik dokuda yıkım sürecinin yapım sürecinden fazla olduğu ve kemik kaybına sebep olan yaygın bir klinik bozukluktur. Osteoporoz kadınlarda erkeklere göre daha çok ortaya çıkmakla birlikte 50 yaşından fazla her üç kadından birinde osteoporoz görülmektedir. Bunun sebebi olarak gençken kemik dokunun yapımını artırıcı etkenlerin az olması ve yaşlılık döneminde kemik kaybının artmasıdır. (Raisz ve Rodan 2003, Downey ve Siegel 2006). Her iki durumda da genetik ve çevresel faktörler etkilidir. Osteoporoz kemik kaybı, yetersiz beslenme, hormonal eksiklikler, sedanter yaşam veya kullanılan ilaçlardan kaynaklı meydana gelmektedir (South-Paul 2001).

Osteoporoz ikiye ayrılmaktadır. Primer osteoporoz herhangi bir kronik hastalık olmaksızın kemik oluşumunda azalma ve kemik harabiyetinde artma ile karakterize bir durumdur. Genellikle yaşlanmayla ve postmenapozal dönemde ortaya çıkmaktadır. Sekonder osteoporoz'da ise kemik yıkımına önemli ölçüde etki eden bir kronik hastalık mevcuttur. Hiperparatiroidizm, maligniteler, gastrointestinal hastalıklar, ilaçlar, böbrek yetmezliği sebep olabilmektedir (South-Paul 2001, Antonucci vd 2005).

Osteoporoz en çok kadınlarda görülmektedir ve bu duruma sebep olan en önemli etken postmenapozal dönemdir. Menopoz menstürasyon döngüsünün durmasıyla beraber oluşan fizyolojik ve doğal bir olaydır. Bu süreçte vücuttaki normal kemik döngüsü östrojen eksikliğine bağlı olarak bozulmaktadır. Osteoklast progenitör hücrelerde ve osteoklastlarda östrojen reseptörlerinin bulunması sebep olmaktadır. Östrojen azalmasına bağlı olarak osteoblastik aktivite azalırken osteoklastik aktivite artmaktadır. IL-1, IL-6 ve TNF gibi osteoklastik aktiviteyi uyaran sitokinlerin veya osteoblastlardaki M-CSF ve RANKL ekspresyonunun artması kemik kaybına neden olabilmektedir. Sonuç olarak yıkılan kemik doku miktarı üretilen kemik doku miktarını geçmektedir. Bu durum da net bir kemik doku kaybına sebep olmaktadır (Lerner 2006, Ji vd 2015).

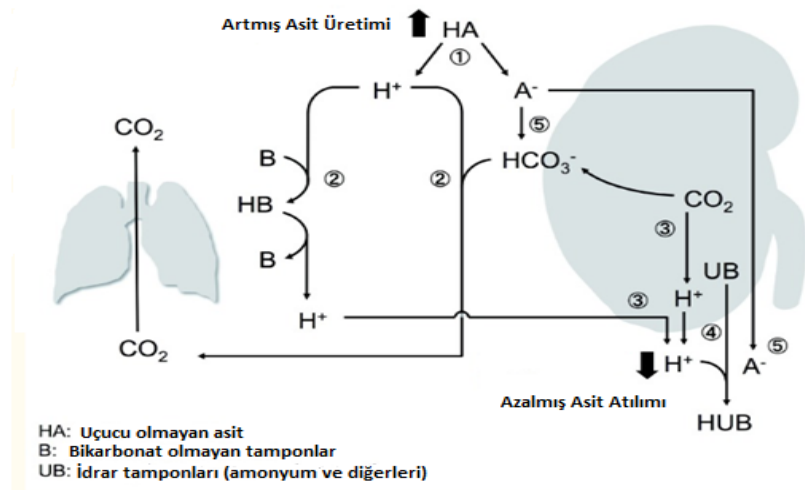
### 2.4. Deneysel Osteoporoz Modeli

Hayvanlarda osteoporoz modeli için literatürde sıkça kullanılan yöntem overektomi (OVX) yöntemidir (Turner 2001). Sıçan overektomi modeli postmenopozal dönemin gösterildiği en iyi yöntemdir (Jie ve Wu 2000). Bu yöntemde literatürde Sprague-Dawley ve Wistar cinsi sıçanların en uygun cins olduğu ve yaklaşık 6 aylık sıçanların da en uygun yaş olduğu belirtilmektedir. Overleri alınan sıçanlar postmenopozal dönemde meydana gelen kemik doku kaybı ve klinik belirtiler yönünden benzerlik göstermektedir (Yousefzadeh vd 2020). Bu süreçte kemik dokuda postmenopozal dönemde görülen

kemik dokunun harabiyeti, biyokimyasal ve histomorfometrik değişimler ve fizikokimyasal değişiklikler görölmektedir. Overektomi kemik dokuda harabiyete neden olarak kemik dokuyu zayıflatıp osteoporozaya neden olup kırıklara sebep olabilmektedir (Lauritzen vd 1993, Egermann vd 2005).

## 2.5. Metabolik Asidoz ve Kemik Doku İlişkisi

Kronik metabolik asidoz düşük pH ile birlikte serum bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) azalması ve kandaki  $\text{H}^+$  iyonunun artması ile vücutta asit birikimine bağlı olarak görölmektedir. Bu asitler uçucu ( $\text{CO}_2$ ) ve uçucu olmayan asitler olarak ikiye ayrılmaktadır. İnsanlarda bu asit-baz dengesi birçok farklı yol ile dengelenmeye çalışılmaktadır. Öncelikli olarak biriken uçucu ve uçucu olmayan asitler bikarbonat iyonları ile tamponlanmaya çalışılmaktadır. Bu tamponlanma işlevi akciğerlerde ve böbreklerde meydana gelmektedir. Tamponlanmanın asidozu dengeleyemediği durumlarda fazla asit böbreklerden dışarı atılmaktadır. Bu homeostatik dengenin herhangi bir şekilde bozulması metabolik asidoza sebep olmaktadır. Aşırı asit üretimi veya yetersiz atılımı bu homeostatik dengeyi bozup asit birikmesine neden olmaktadır. Bu durum metabolik asidoz ile sonuçlanmaktadır (Pham vd 2015). Vücuttaki asit-baz dengesinin nasıl sağlandığı Şekil 2.4.' te gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Vücuttan asit atılımı yolları (Pham vd 2015).

1. Uçucu olmayan asit (HA)  $\text{H}^+$  iyonuna ve organik anyonlarına ( $\text{A}^-$ ) ayrıştırılmaktadır.

2.  $\text{HCO}_3^-$   $\text{H}^+$  iyonu ile birleşerek  $\text{CO}_2$  şeklinde akciğerlerden atılmasına sebep olmakta; bu durumda da vücuttaki  $\text{HCO}_3^-$  miktarı azalmaktadır. Öte yandan bikarbonat olamayan tamponlar (B)  $\text{H}^+$  iyonunu bağlayarak böbreklerden atılmasını sağlamaktadır.

3.  $\text{CO}_2$  böbreklerde  $\text{H}_2\text{O}$  ile  $\text{HCO}_3^-$   $\text{H}^+$  ya parçalanmaktadır.  $\text{HCO}_3^-$  kana verilirken geriye  $\text{H}^+$  idrarla vücuttan uzaklaştırılmaktadır.

4. Şekildeki 3 numaralı aşamada ayrılan  $\text{H}^+$  iyonları idrar tamponları (UB) ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır.

5. Organik anyonlar ( $\text{A}^-$ )  $\text{HCO}_3^-$  rejenere etmek için kullanılmaktadır. Rejenere edilemeyen  $\text{A}^-$  lar böbreklerden dışarı atılmaktadır.

Kronik metabolik asidozun dengelenmesinde kemik doku önemli bir tampon görevi görmektedir. Asidoza maruz kalan kemikte fizikokimyasal çözünmeler meydana gelmekte olup bu çözünme sırasında kemikteki minerallerden sodyum, potasyum, kalsiyum ve fosfatta düşüşler görülmektedir (Bushinsky 1994, Comelekoglu vd 2007). Artan asidoza bağlı olarak osteoklastik ve osteoblastik genlerin ekspresyonlarında farklılıklar oluşmakta, artan asidoza bağlı olarak osteoblastik aktivitede azalma meydana gelirken osteoklastik aktivitede artış meydana gelmektedir (Bushinsky 1994). Osteoblastlar proton sensör proteinleri ile ortamın asit seviyesini algılayabilmektedir. OGR-1 kemik hücrelerinde proton sensörü olarak birincil bir role sahiptir (Frick vd 2009). Artan asit seviyesinin OGR-1 tarafından algılanmasından sonra ortamdaki osteoblastik siklooksijenaz (COX-2) mRNA ve protein ekspresyonu artmaktadır (Krieger vd 2007). Bu artış osteoblastik PGE2 (ProstaglandinE2) sekresyonunun uyarılmasına sebep olmaktadır (Kapinas ve Delany 2011). PGE2 hem kemik rezorpsiyonu hem de oluşumu üzerinde etkileri olan güçlü çok fonksiyonlu düzenleyicilerdir. Bu nedenle, PGE2'nin asidoz indüklü sentezi, osteoblastik prostaglandin reseptörlerinin otokrin veya parakrin stimülasyonuna neden olmaktadır. Bu reseptörlerin aktivasyonu sonuç olarak RANKL RNA ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır. Bu durum da osteoklastogenezi ve olgun osteoklastların aktivasyonunu artırmaktadır.

## 2.6. Kronik Metabolik Asidoz Modeli

Kronik metabolik asidoz oluşması için vücutta  $\text{H}^+$  iyonunun artması ve serum  $\text{HCO}_3^-$  seviyesinin azalması gerekmektedir. Bu metabolik bozukluğun sıçanlarda oluşturulması için literatürde kullanılan 2 yöntem vardır. Bunlardan biri içme suyuna



NH<sub>4</sub>Cl ekleyip içme suyundan NH<sub>4</sub>Cl alınıp metabolik asidoza girilmesi sağlanmaktadır. Bu yöntemde hayvanların suyu içmemesinden kaynaklı aksaklıklar çıkabileceği için literatürde en çok kullanılan yöntem içme suyunda çözeltiilmiş NH<sub>4</sub>Cl' ün gavaj yoluyla sıçanlara verilmesidir (Kraut vd 1986, Gasser vd 2014, Aryal vd 2021). Yapılan çalışmalarda 6 hafta ve 10 hafta NH<sub>4</sub>Cl' e maruz kalan sıçanlarda metabolik asidoz olduğu gözlemlenmiştir. Kronik metabolik asidoz oluşup oluşmadığını kanıtlamak için sıçanlara kan gazı analizi yapıp kan pH ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> seviyelerine bakılmaktadır.

## **2.7. Hipotez**

H1: Kronik metabolik asidoza ve overektomi sonucu osteoporoz maruz kalmış kemik dokuda ALP, OC, Runx2, Tip 1 kollajen, OPG protein ve enzimlerinin ekspresyon seviyeleri azalır

H2: Kronik metabolik asidoz ve overektomi sonucu osteoporoz maruz kalmış kemik dokudaki RANKL, RANK proteinlerinin ekspresyon seviyeleri artar

H3: Kronik metabolik asidoz ve overektomi kemik dokuda tahribat yaratarak kemik dokunun biyomekanik, fiziko-kimyasal ve mikromimari yapısını bozar.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

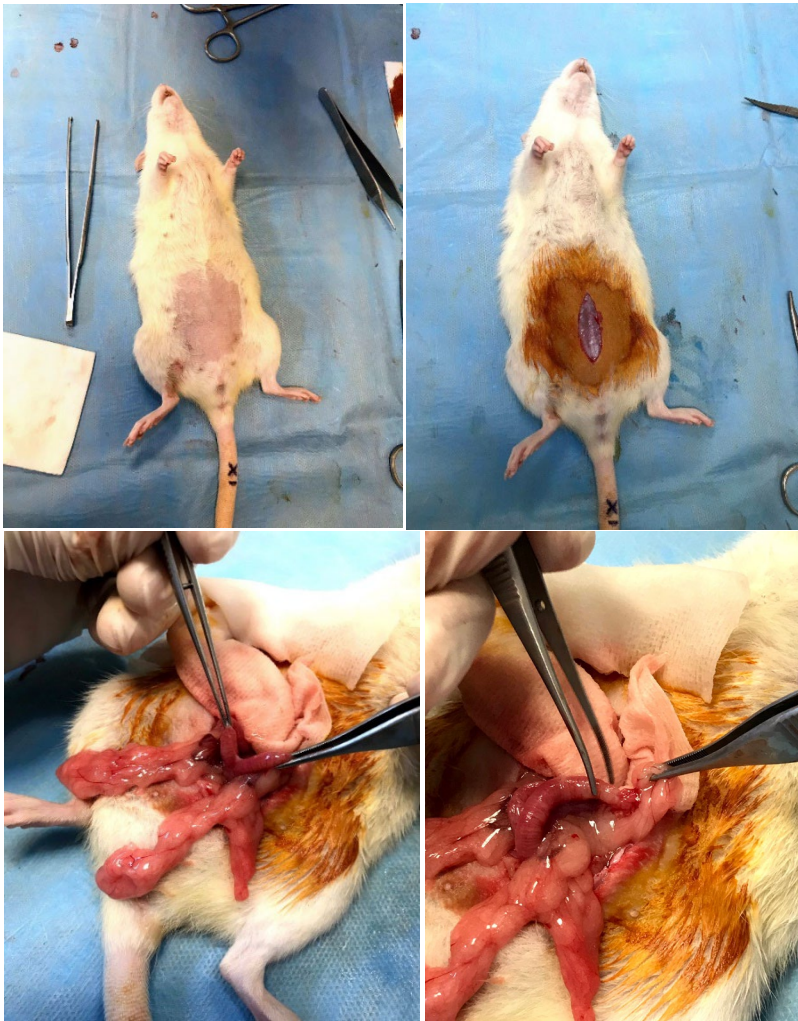
#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamıza başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na başvurularak 01/ 10/ 2020 tarih ve 60758568- 020/ 59574 sayılı onay kararı alınmıştır.

Etik kurul kararı alındıktan sonra Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan 180-200 gr ağırlıkları arasında Spraque Dawley cinsi 60 adet 10-12 haftalık yetişkin dişi sıçan alınıp kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele seçilerek Kontrol Grubu (KONT grubu; n=12), Sham Grubu (Sham grubu; n=12), Kronik Metabolik Asidoz Grubu (KMA grubu; n=12), Overektomi Grubu (OVX grubu; n=12) ve), Kronik Metabolik Asidoz+ Overektomi Grubu (OVX+KMA grubu; n=12) olmak üzere 5 eşit gruba ayrılmıştır. Tüm gruplar deney hayvanları için özel hazırlanmış 30x 35x 17 cm ölçülerindeki kafeslerde tutulmuşlardır. Kafeslerin alt kısımları plastik üst kısımları ise telle çevrilidir. Deney hayvanlarının tümü 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde, 22±20 C oda sıcaklığında ve %50±5 nem değerlerindeki uygun laboratuvar ortamında bulundurulmuşlar ve aynı türdeki besinlerle beslenmişlerdir. Bu besin 2750 KCal/ Kg enerji bulundurmakta, yaşam için yeterli selüloz, yağ, protein ve mineralleri içermektedir. Tüm sıçanlar deney başlangıcından itibaren 2 hafta aralıklar olacak şekilde deney sonuna kadar ağırlıkları dijital tartı ile ölçülerek takip edilmiştir.

### 3.2. Overektomi Modelinin Oluşturulması

OVX ve OVX+KMA gruplarındaki 24 hayvana deney başlamadan önce overektomi işlemi yapılmıştır. Overektomi literatürde deney hayvanlarında osteoporoz için en çok kullanılan yöntemdir (Comelekoglu vd 2007, Donmez vd 2012). Hayvanlara overektomi işlemi yapılmak üzere önce ketamin 87 mg/kg ile xylazine 13 mg/kg kullanılıp anestezi uygulanmıştır. Anestezi altındaki hayvanların önce karın bölgeleri tıraşlanmış daha sonra karın bölgesinden ventral olarak insizyon yapılmıştır. Uterus izlenerek iki taraftaki overler bulunup alınmıştır. Sonrasında insizyon yerleri sütünle edilip kapatılmıştır. Sham grubunda bulunan hayvanların ise karın bölgeleri tıraşlanıp ventral bölgeden insizyon yapılmış ve sütünle edilmiştir. Başka bir işlem uygulanmamıştır. Hayvanlar denetim altında tutulup herhangi bir komplikasyon gelişip gelişmeyeceği gözlemlenmiştir. Yapılan işlemler şekil 3.1 de verilmiştir.



**şekil 3.1.** Ventral İnsizyon ile Uterusun Takibi ve Overlerin Alımı

### 3.3. Kronik Metabolik Asidoz Modelinin Oluşturulması

KMA ve OVX+KMA grubundaki hayvanlara kronik metabolik asidoz oluşturmak için Sigma- Aldrich şirketinin Riedel-de Haen Ammonium Chloride 11209 numaralı NH<sub>4</sub>Cl (amonyum klorür) kullanılmıştır. Literatürde kullanılan yöntemler araştırılarak uyguladığımız yöntemle göre hayvanlara 10 hafta boyunca gavaj yoluyla günde iki kez 15 mEq/kg dozunda NH<sub>4</sub>Cl verilmiştir (Gasser vd 2014). NH<sub>4</sub>Cl verilen hayvanlarda H<sup>+</sup> seviyesinin artmasına bağlı olarak pH seviyesi düşmektedir. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kullanılarak asit-baz dengesi sağlanmaya çalışılmaktadır. Azalan HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> seviyesinin ardından denge sağlanamayıp metabolik asidoz meydana gelmektedir.

### 3.4. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi, Dokuların Alınması

Çalışmamızda 10 haftanın sonunda hayvanlara intraperitoneal olarak anestezi uygulanmıştır. Anestezi altındaki hayvanlar supin pozisyonda yatırılıp karın bölgesi ventral olarak insize edilmiştir. Öncelikli olarak kan gazı analizi için aorta abdominalis'ten heparinli enjektör ile 2ml kan alınmış sonrasında biyokimyasal deneyler için 5 ml daha kan alınmıştır (şekil 3.2). Sakrifiye edilen hayvanlardan sağ ve sol olmak üzere femur ve tibia kemikleri dikkatli bir şekilde diseke edilerek çıkartılmıştır. Elde edilen 24 adet femur ve 24 adet tibia kemiklerinin etrafındaki kaslar ve ligamentler temizlendikten sonra 24 adet femur serum fizyolojikle ıslatılmış gazlı bezlere sarılıp deneyler yapılana kadar -20C° de saklanmıştır. 3 adet tibia ise serum fizyolojikle ıslatılmış gazlı bezlere sarılıp deneyler yapılana kadar -80C°de saklanmıştır. 21 adet tibia ise serum fizyolojikle ıslatılmış gazlı bezlere sarılıp deneyler sırasında karşılaşılabilecek problemlere karşı -20 C° de saklanmıştır.



**Şekil 3.2** Kan gazı alımı

### 3.5. Kemik Dokudan RT-PCR Deneyleri

Çalışma kapsamında her gruptan 5 adet tibia kullanılarak RT-PCR yöntemiyle gen ve protein ekspresyon düzeyleri Pamukkale Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda incelenmiştir.

RT-PCR: Tüm gruplarda yapılacak RT-PCR deneyleri ile metabolik asidoz modelinin (ALPL, COL1A1, TNFSF11 (RANKL), TNFSF11B (OPG), BGLAP, Runx 2, PHEX ve MEPE) mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimleri incelenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar kontrol verilerine göre karşılaştırılıp değerlendirilmiştir.

Total RNA İzolasyonu: Dokular homojenize olması için öncelikle havanda sıvı nitrojen ile dövülüp yeterli boyuta getirilmiştir. RNA Mini Kit (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) kullanılarak dokulardan RNA izole edilmiştir. Kitte mevcut olan protokole göre RNA izolasyonu yapmak için gruplardan yaklaşık 50 – 60 mg doku örneği alınıp 1 ml trizol reaktifi ile birlikte homojenize edilmiştir. Homojenize edilen dokular santrifüj edildikten sonra RNA tüplerine alınmıştır. Alınan tüpte wash buffer ile 3-4 defa yıkanıp saf RNA tüpün en altında biriktirilmiştir. Elde edilen RNA kullanılarak gerekli olan cDNA sentezlenmiştir.

cDNA Sentezi: cDNA üretimi için yüksek kapasiteli RNA dan cDNA kiti kullanılmıştır. Kullanılan kitteki protokole göre RNA, DNaz ve RNaz bulunmayan steril su ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş RNA'ya ilgili enzim ve buffer eklenmiştir. Üretilen cDNA'lar kullanılarak PCR analizi yapılmıştır.

PCR: PCR analizlerini yapmak üzere, NCBI' de kayıtlı olan ve insanda tanımlanan (ALPL, COL1A1, TNFSF11 (RANKL), TNFSF11B (OPG), BGLAP, Runx 2, PHEX ve MEPE) mRNA gen dizilimleri örnek alınarak her bir gene özel olarak primerler tasarlanmıştır. Ayrıca, kuyulara eşit miktarda RNA konduğunu kanıtlamak amacıyla GAPDH mRNA ekspresyon değerleri de ölçülerek değerlendirilmiştir. PCR reaksiyonu, cDNA üzerinde SYBR Green Master Mix adlı kiti kullanılarak (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) her bir gen kendine özgü hazırlanan PCR programı ile analiz edilmiştir. Kullanılan kitte tavsiye edilen protokole göre öncül ve tamamlayıcı primerler, SYBR ve cDNA birleştirilerek numüneler hazırlanmış PCR cihazında ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümler kaydedilmiştir.

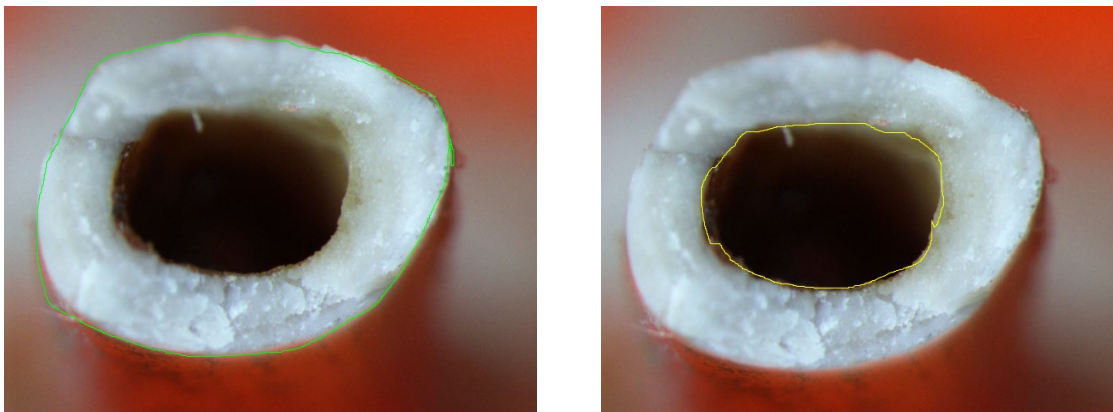
### **3.6. Mikro-BT Görüntülemeleri ve Analizleri**

Mikro-BT görüntüleme ve analizleri Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde yapılmış olup her bir gruptan 10 adet femur kullanılmıştır. Deney ve kontrol gruplarından diseke edilerek çıkartılan femur örnekleri uygun boyutlardaki standart bir sample holder içerisine yerleştirilerek Mikro-BT cihazı (Bruker Skyscan 1275, Kontich, Belgium) ile taranmıştır. Tarama parametreleri 80 kVp enerji, 125  $\mu$ A yoğunluk (intensity), 10  $\mu$ m voxel size, 360 derece çekim, 0.2 döndürme derecesi ve 49 ms integration time (maruziyet süresi) olarak belirlenmiştir. Filtre olarak 0.1 mm Al kullanılmıştır. Elde edilen ham data görüntüleri (.tif formatında 1800 adet radyografi) NRecon rekonstrüksiyon yazılımı (SkyScan, Antwerp, Belçika) ile tekrardan oluşturulmuş ve bu aşamada tarama sırasında oluşan radyolojik artefaktlar giderilmiştir. Bu işlem sonrasında numunelerin aksiyel kesit görüntüleri (.bmp formatında) elde edildikten sonra bu görüntüler Dataviewer yazılımına (SkyScan, Antwerp, Belçika) yüklenmiştir ve örnek çoklu eksenlerde (aksiyal, koronal, sagittal ve modifiye eksenlerde) görüntülenmiştir. Numunelerin mikro kemik yapısının 3 boyutlu analizleri için CTAn (SkyScan SkyScan, Antwerp, Belçika) yazılımı kullanılmıştır. Yapılacak bu analizler sırasıyla Yüzde Hacim (kemik hacminin incelenen bölgedeki toplam hacmine oranı),

Toplam Hacim (Toplam kemik hacmi), Trabeküler Hacim (Trabeküler kemik hacmi), Trabeküler Kalınlık (Doğrudan 3D ölçüm yöntemleri kullanılarak değerlendirilen trabeküllerin ortalama kalınlığı), Trabeküler Ayrılma (Doğrudan 3D ölçüm kullanılarak değerlendirilen trabeküller arasındaki ortalama mesafe) olmuştur.

### 3.7. Biyomekanik Testler (Üç Nokta Eğme Testi)

Biyomekanik testler Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi'ne bağlı Makine Mühendisliği Bölümü'nde yapılmış olup her bir gruptan 12 adet femur kullanılmıştır. Bu deneyde kemikler, femur kemiğini tutan aparatlar arasında 2,6 cm mesafe bırakılarak yerleştirilmiştir. 2mm/dk hız ile kemik eğme aparatıyla eğme işlemine başlanıp kırılma işlemi gerçekleşene kadar kuvvet uygulanmıştır. Yapılan eğme deneyinde sürekli olarak kuvvet artırılmış bu sırada kemiğin tam orta bölümünde meydana gelen çökme değeri kaydedilmiştir. Artan kuvvete bağlı olarak femur gövdeleri kırılmıştır. Kırılan femurlar en ince kısımlarından elektrikli rotor ile düz bir şekilde kesilip mikroskop altında fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen femur fotoğraflarından yüzey alanı hesaplamaları yapılmıştır. Hesaplamalar için Image J programı kullanılmıştır. Program yardımı ile kemik dokunun dış çapı, iç çapı (mm cinsinden) çizilerek bulunmuştur (Şekil 3.3). Toplam yüzey alanı (mm<sup>2</sup> cinsinden) çizilip hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer ise flexural strength değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Ölçülen değerler kullanılarak uygulanan kuvvet karşısında kemik dokuda ne kadar çökme oluştuğunu gösteren grafik elde edilmiştir. Elde edilen grafik, eğme dayanımı (flexural strength) değerini gösterip kemik dokunun fiziksel dayanıklılığı hakkında bilgi verecektir.



Şekil 3.3 ImageJ Programı İle İç ve Dış Çapın Hesaplanması

### 3.8. Raman Spektroskopi Analizi

Kemiklerin Raman spektroskopi analizi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde yapılmıştır. Daha önce yayınlanmış makalelerdeki protokol takip edilerek her gruptan 10 adet femur numunesinin üzerinden 10 farklı rastgele seçilmiş noktadan Raman spektrumları, 785 nm lazer, x20 mikroskop lensi ve lazer gücü yaklaşık 35 mW geçmeyecek şekilde toplanmıştır. Her bir Raman spektrumu için lazer ortalama 10sn ve 10 defa lazer atımı yapacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm Raman spektrum verileri toplandıktan sonra, her femur numunesi için toplanan 10 Raman spektrumun ortalaması alınarak tek bir femur Raman spektrumuna dönüştürülmüş ve bu spektrum üzerinden analizler yapılmıştır. Analizler yapılmadan önce, Raman spektrumunun floresan arka planı Labspec programı ile ortadan kaldırılıp, gerekli olduğu halde sistemin arka planından gelen parazit sinyaller aynı program ile pürüzsüzleştirilerek düzeltilmiştir. Bu ön işlemlerden sonra, femurun dokusal karakterizasyonu için kullanılan geleneksel Raman ölçümleri hesaplanmıştır. Bunlar mineral-organik matriks band oranları (Fosfat/Amide I, Fosfat/Amide III, Fosfat/CH<sub>2</sub> ve Fosfat/ Proline), Carbon/Fosfat, Kristalleşme parametresi (Fosfat bandının 1/FWHM hesabı), Amide I Raman bandında bulunan 1670/1640 ve 1670/1690 oranları kullanılarak kontrol grupları ile karşılaştırılıp değerlendirilmiştir.

### 3.9. Total Antioksidan Seviyesi- Total Oksidan Seviyesi Ölçümleri

Total antioksidan seviyesi (TAS) total oksidan seviyesi (TOS) testleri Pamukkale Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı' nda yapılmıştır. 10 haftanın sonunda her bir gruptan her bir hayvandan aorta abdominalis'ten 5 ml kan alınarak ELİSA yöntemi ile ölçülmüştür. Metabolik asidozun kemik dokudaki oksidan stres üzerindeki etkisini ortaya koymak amacıyla Rel Assay Diagnostics TAS ve TOS kiti kullanılmıştır. TAS ve TOS için kittede gösterildiği üzere 18µl örnek alınıp kuyulara konulmuştur. Her bir örnek için 300µl Reaktif 1 eklenmiştir. Karışım 30 sn bekletildikten sonra üzerine 45µl Reaktif 2



eklenmiştir. Reaktifler eklendikten sonra 5 dk 37°C bekletilip sonuçlar 660 nm'de okuyucuda okunmuştur. TAS ve TOS seviyeleri bulunduğundan sonra (TOS/TAS) \*100 formülü ile oksidatif stres indeksi (OSİ) bulunmaktadır.

### 3.10. Serum Osteokalsin ve Serum Alkalen Fosfataz Ölçümü

Serum osteokalsin ve serum alkalen fosfataz ölçümü Pamukkale Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmamızın 10. Haftasında her bir deney hayvanından alınan 2 ml arterial kan Elisa yöntemi ile ölçülmüştür. Elabscience Rat OC/BGP (Osteocalcin) Elisa kiti ve Rat ALPL (Alkalene Phosphatase Liver/Bone/Kidney) Elisa kiti kullanılmıştır. Kite belirtildiği üzere her bir kuyuya 100 µl örnek koyularak 37°C'de 90 dk inkübatörde beklenilmiştir. Daha sonra plaka boşaltılıp 100 µl Biotinlyted Detection eklenip 37°C'de 60 dk inkübatörde beklenilmiştir. Plaka 3 kere yıkanmıştır. 100 µl HRP Conjugate eklenerek 37°C'de 30 dk inkübatörde beklenilmiştir. Plaka 5 kere yıkanmıştır. 90 µl Substrate Reagent eklenip 37°C'de 15 dk inkübatörde beklenilmiştir. 50 µl Stop Solution eklenerek kit sonlandırılmıştır. 450 nm'de plaka okuyucuda okunmuştur. Her iki çalışma içinde ilgili kit ile aynı aşamalar yapılmıştır. Yapılan ölçümler kaydedilip diğer gruplar ile karşılaştırılmıştır.

### 3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizleri yapılacak kantitatif parametreler:

- 1- Serum osteokalsin ve serum alkalen fosfataz seviyeleri
- 2- TAS ve TOS ölçümleri
- 3- Biyomekanik testlerden elde edilecek sonuçlar: Eğme Dayanımı
- 4- Mikro-BT ölçümleri Yüzde Hacim (kemik hacminin incelenen bölgedeki toplam hacmine oranı), Toplam Hacim (Toplam kemik hacmi), Trabeküler Hacim (Trabeküler

kemik hacmi), Trabeküler Kalınlık (Doğrudan 3D ölçüm yöntemleri kullanılarak değerlendirilen trabeküllerin ortalama kalınlığı), Trabeküler Ayrılma (Doğrudan 3D ölçüm kullanılarak değerlendirilen trabeküller arasındaki ortalama mesafe)

5- Raman spektrofotometresi: Mineral matriks -organik matriks band oranı, (Fosfat/Amide I, Fosfat/Amide III, Fosfat/CH<sub>2</sub> ve Fosfat/ Prolin), Carbon/Fosfat, Kristalleşme parametresi (Fosfat bandının 1/FWHM hesabı), Amide I Raman bandında bulunan 1670/1640 ve 1670/1690 oranları

Kalitatif, semikantitatif parametreler:

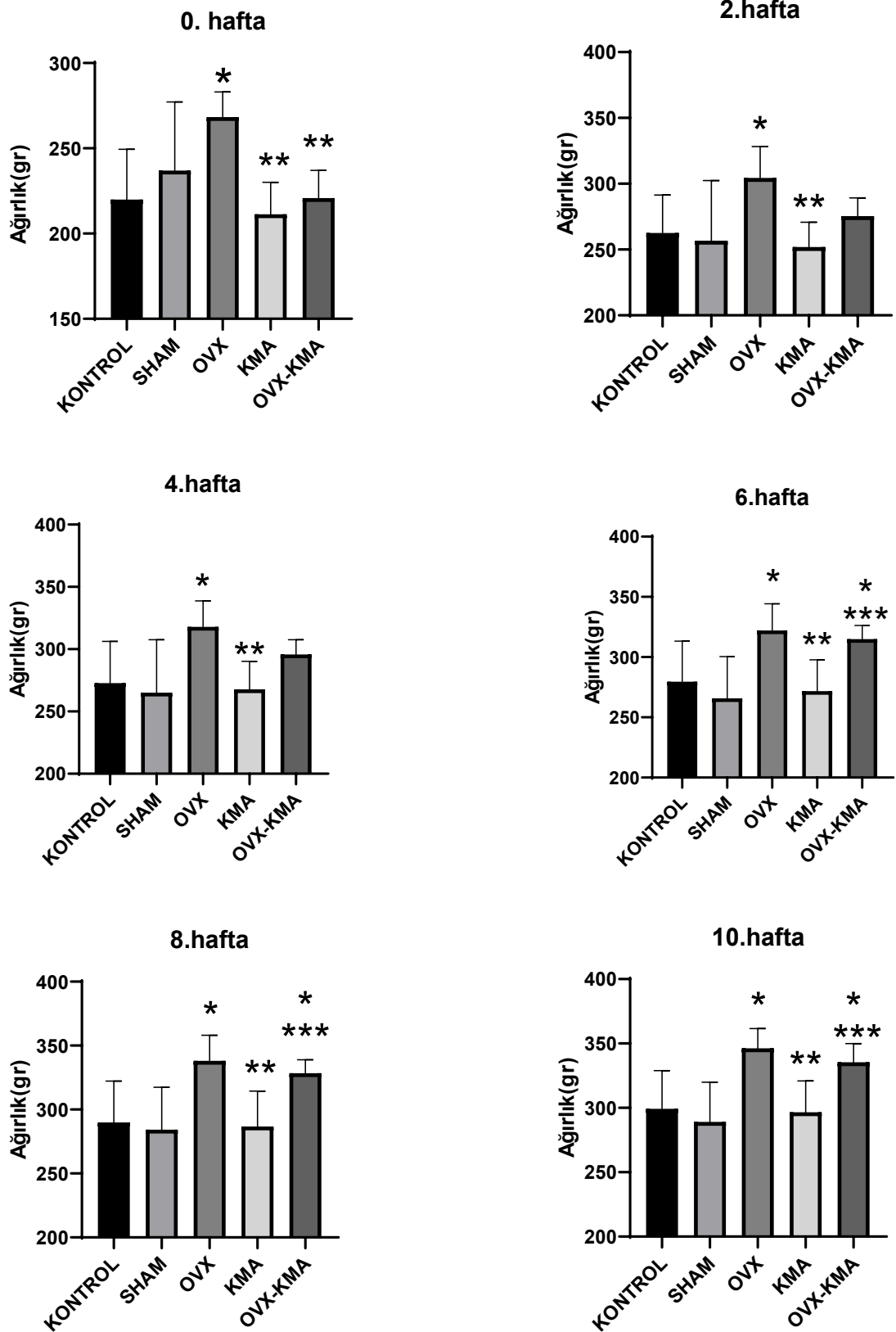
6- PCR: (ALPL, COL1A1, TNFSF11, TNFSF11B, BGLAP, Runx 2, PHEX ve MEPE) mRNA seviyeleri

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunlukları test edilmiştir. Normal dağılıma uygun veriler ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme ile gruplar arasında farka bakılmıştır. ANOVA sonucunda gruplar arasındaki farkın anlamlı bulunduğu durumlarda post-hoc analiz kullanılmıştır. Post-hoc test olarak Tukey Testi kullanılıp her bir grup kendi arasında değerlendirilmiştir.

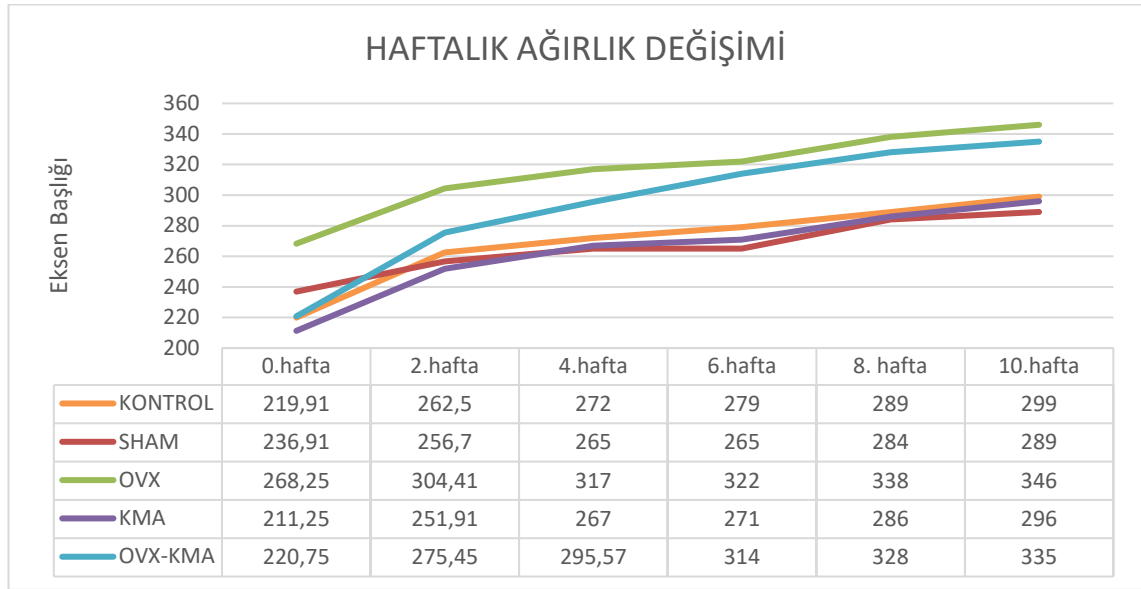
## 4. BULGULAR

### 4.1. Ağırlık Ölçümü Bulguları

Çalışmamızda 10 hafta boyunca 2 haftalık dönemlerde tüm hayvanların ağırlıkları digital tartı ile ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Çalışma başlangıcında yapılan ölçümde (0. hafta) OVX grubunun ağırlığı KONT grubuna göre fazladır ( $p<0.05$ -ANOVA). Çalışmanın 2. ve 4. Haftasında yapılan ölçümde OVX grubu ile KONT grubu arasındaki fark devam etmiştir. ( $p<0.05$ -ANOVA). Çalışmanın 6. 8. ve 10. haftasında yapılan ölçümde OVX ile KONT grubu arasındaki fark devam ederken OVX-KMA grubunun ağırlığı KONT grubuna göre artmıştır ( $p<0.05$ -ANOVA). Haftalık ağırlık değişimi grafiğine bakıldığında OVX grubunda diğer gruplara göre artış meydana gelmiştir. Ancak en fazla artış oranı OVX-KMA grubunda meydana gelmiştir. Yapılan ölçümler Şekil 4.1. ve 4.2. de gösterilmektedir.



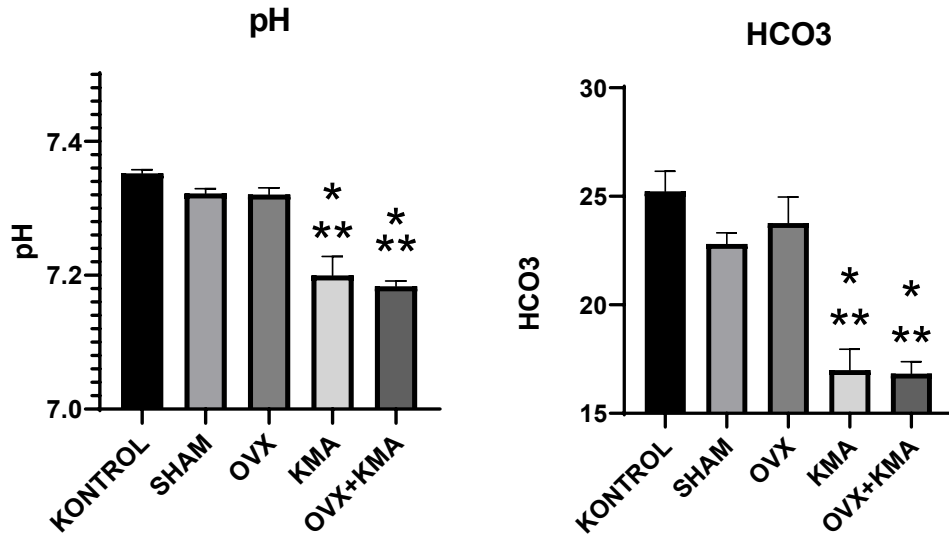
**Şekil 4.1** Ağırlık ölçümünün haftalara göre gösterilmesi (\* Kontrol, \*\* OVX, \*\*\* KMA grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır  $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.2** Ağırlık ölçümünün haftalık değişiminin gösterilmesi

#### 4.2. Kan Gazı Ölçümü Bulguları

Çalışmamızın 10. haftasında yapılan kan gazı ölçümleri sonucunda deneklerin pH ve  $\text{HCO}_3$  değerleri kaydedilip karşılaştırılmıştır. KMA ve OVX-KMA grubunun pH seviyesi ile  $\text{HCO}_3$  seviyesi KONT grubu ve OVX grubuna göre düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ -ANOVA). Çalışmamız gösteriyor ki  $\text{NH}_4\text{Cl}$  uygulaması gruplarda kan pH'ında azalmaya neden olmuştur. Bu azalmaya bağlı olarak  $\text{HCO}_3$  seviyelerinde de azalma meydana gelmiştir. OVX grubu ile KONT ve SHAM grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. KMA ve OVX-KMA arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yapılan ölçümler Şekil 4.3 de ve Tablo 4.1 de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3** Kan gazı ölçümü yapılan grupların pH ve HCO<sub>3</sub> değerlerinin gösterilmesi (\* Kontrol, \*\* OVX, \*\*\* KMA grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır p<0.05).

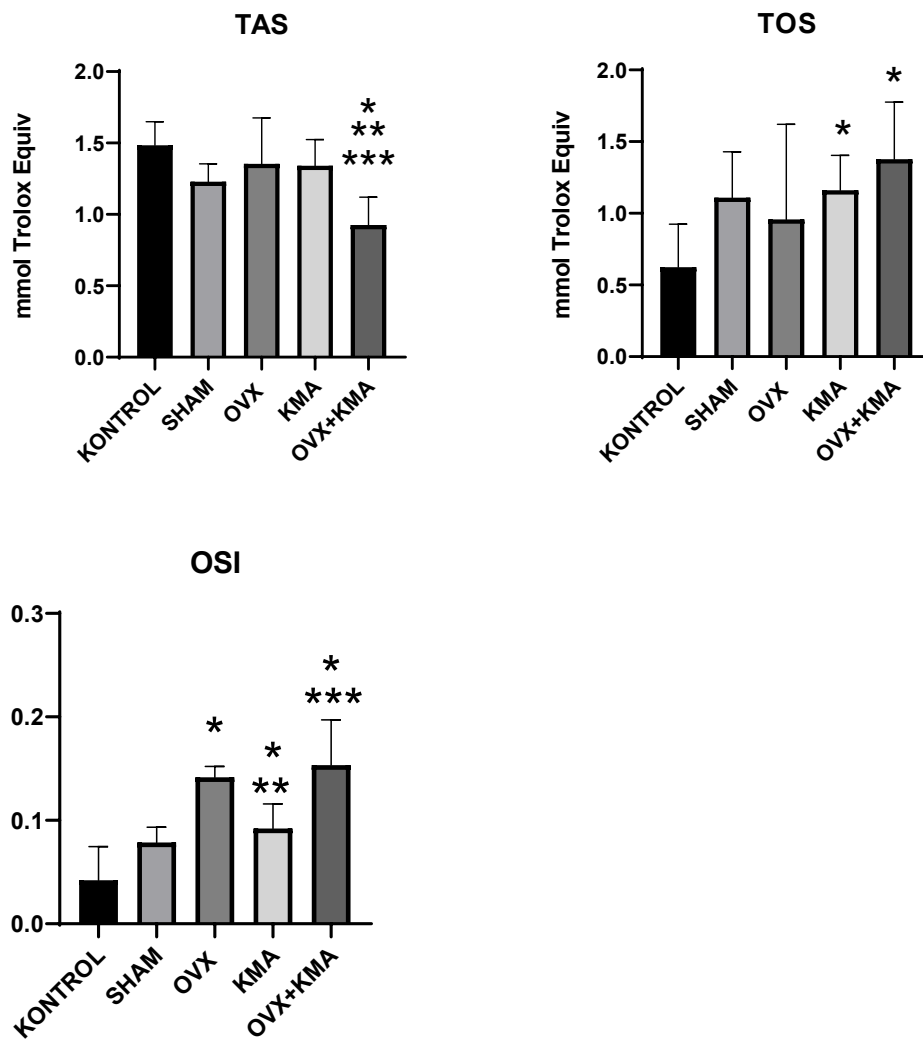
	KONTROL	SHAM	OVX	KMA	OVX-KMA
pH	7.352 ± 0.005	7.322 ± 0.007	7.321 ± 0.009	7.200 ± 0.028	7.184 ± 0.007
HCO <sub>3</sub>	25.23 ± 0.929	22.80 ± 0.519	23.77 ± 1.206	16.99 ± 0.963	16.84 ± 0.544

**Tablo 4.1** Kan pH ve HCO<sub>3</sub> değerlerinin gösterilmesi

#### 4.3. Total Antioksidan Seviyesi-Total Oksidan Seviyesi Ölçümü Bulguları

Çalışmamızın 10. haftasında TAS-TOS ölçümü sonuçları kaydedilip karşılaştırılmıştır. TAS seviyeleri karşılaştırıldığında OVX-KMA grubunun TAS seviyesi KONT, OVX ve KMA gruplarına göre daha düşük bulunmuştur (p<0.05-ANOVA). TOS seviyeleri karşılaştırıldığında KMA ve OVX-KMA grubunun TOS seviyeleri KONT grubuna göre artış göstermiştir. OSİ seviyeleri karşılaştırıldığında ise OVX, KMA ve

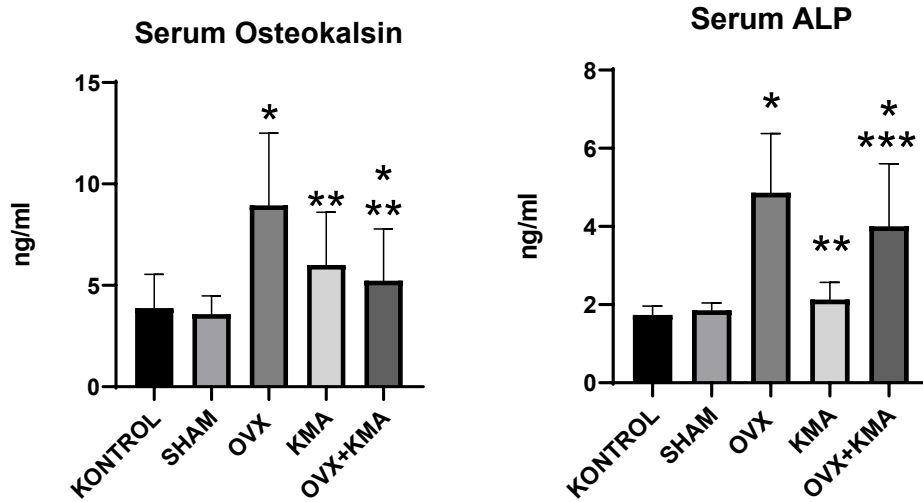
OVX-KMA gruplarının OSI değeri KONT grubuna göre artmıştır ( $p<0.05$ -ANOVA). KMA grubunda meydana gelen bu artış KONT grubuna göre fazla olmakla birlikte OVX ve OVX-KMA grubuna göre düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ -ANOVA). Elde edilen sonuçlara göre OVX-KMA grubunda antioksidan seviyesi düşmüştür. KMA ve OVX-KMA gruplarında oksidan seviyesi artmıştır. TAS ve TOS sonuçlarından elde edilen OSI değerine baktığımızda işlem göre OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarının oksidatif indeksi artmıştır. Ortaya çıkan bu sonuçlar KMA' ya maruz kalan hayvanları hasara açık hale getirmektedir. Yapılan ölçümler Şekil 4.4. de gösterilmiştir.



**Şekil 4.4** TAS, TOS ve OSI değerlerinin gösterilmesi ( \* Kontrol, \*\* OVX, \*\*\* KMA grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır  $p<0.05$ ).

#### 4.4. Serum Osteokalsin ve Serum Alkale Fosfataz Ölçümü Bulguları

Serum osteokalsin seviyelerine bakıldığında OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında KONT grubuna karşı artış meydana gelmiştir ( $p<0.05$ -ANOVA). OVX grubundaki artış KMA ve ve OVX-KMA grubuna göre daha fazla meydana gelmiştir ( $p<0.05$ -ANOVA). Serum alkale fosfataz seviyelerine bakıldığında OVX ve OVX-KMA gruplarında KONT grubuna karşı bir artış meydana gelmiştir ( $p<0.05$ -ANOVA). KMA grubu OVX ve OVX-KMA grubuna göre düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ -ANOVA). Serum OC ve ALP seviyeleri OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında artmıştır. Kemik dokunun yapım biyobelirteçlerinden olan OC ve ALP değerlerinin artması kemik dokudaki yapım biyobelirteçlerinin yeterli olmadığını ve yıkıma maruz kaldığını göstermektedir. Yapılan ölçümler Şekil 4.5. de gösterilmiştir.

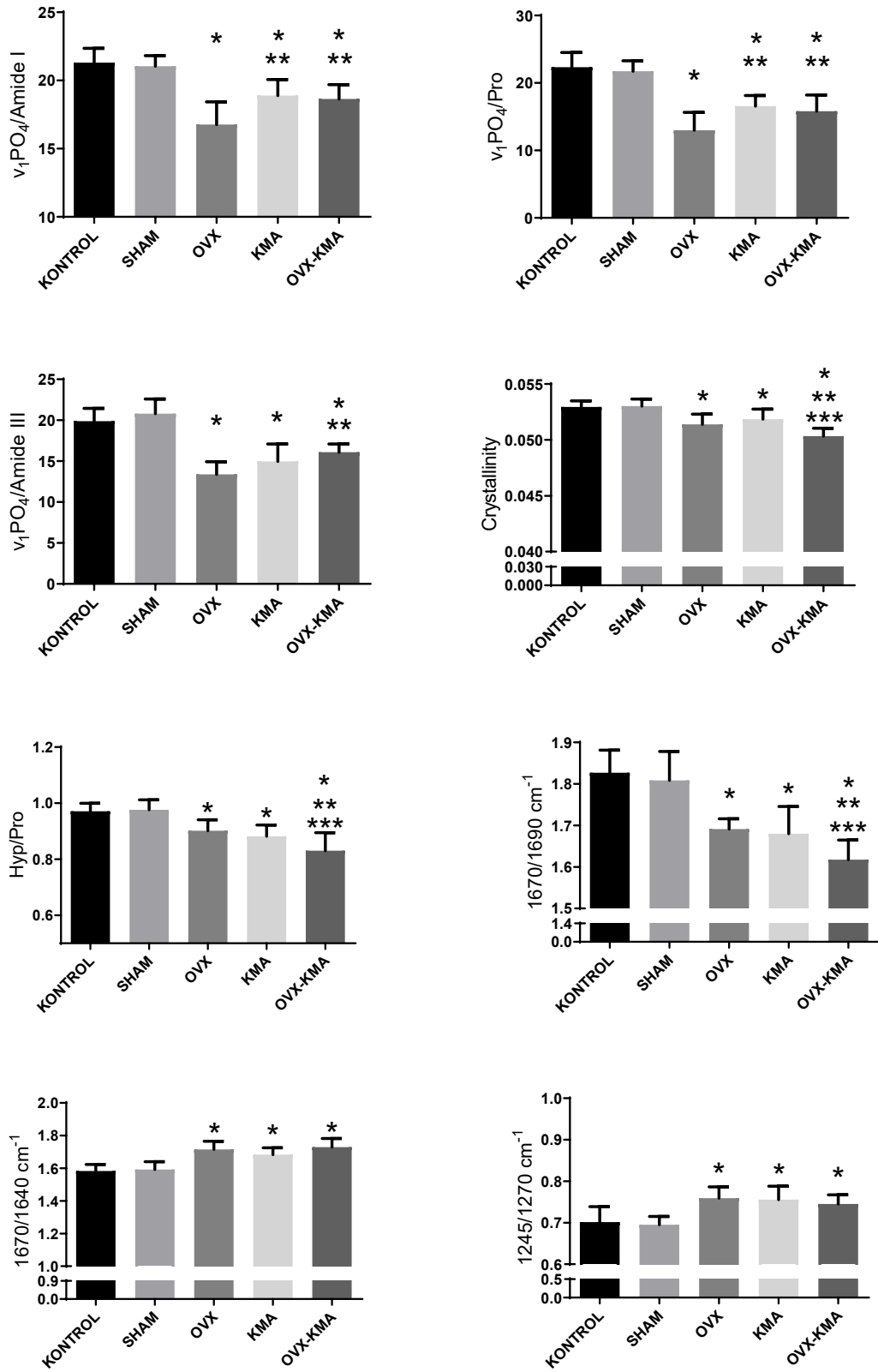


**Şekil 4.5** Serum Alkale Fosfataz ve Serum Osteokalsin değerlerinin gösterilmesi ( \* Kontrol, \*\* OVX, \*\*\* KMA grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır  $p<0.05$ ).



#### 4.5. Raman Spektroskopisi Ölçümü Bulguları

Raman spektroskopisi aleti ile ölçüm yapıp elde edilen sonuçlardan literatüre göre Fosfat/Amide1, Fosfat/Amide3, Fosfat/Prolin, Kristalleşme, Hidroksiprolin/Prolin, 1670/1640, 1670/1690, 1245/1270 değerleri karşılaştırılmıştır. Fosfat/Amide1 ve Fosfat/Prolin sonuçlarında OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında KONT grubuna göre düşüş bulunmaktadır ( $p < 0.05$ -ANOVA). OVX grubunda KMA ve OVX-KMA grubuna göre daha fazla düşüş meydana gelmiştir ( $p < 0.05$ -ANOVA). Fosfat/Amide3 sonuçlarına bakıldığında OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında KONT grubuna göre düşüş bulunmaktadır ( $p < 0.05$ -ANOVA). OVX grubunda OVX-KMA grubuna göre daha fazla düşüş meydana gelmiştir ( $p < 0.05$ -ANOVA). Kristalleşme ve Hidroksiprolin/Prolin ve 1670/1690 sonuçlarına bakıldığında OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında KONT grubuna göre düşüş bulunmaktadır ( $p < 0.05$ -ANOVA). OVX-KMA grubundaki düşüş OVX ve KMA grubuna göre daha fazladır ( $p < 0.05$ -ANOVA). Bu sonuçlara göre OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında KONT grubuna göre düşüş vardır. Bu çalışığımız parametreler kemik mineral matriksinin göstergesidir. Bu değerlerde meydana gelecek düşüklükler kemik mineral matriks oranının düştüğünü göstermektedir. 1670/1640 ve 1245/1270 sonuçlarına bakıldığında OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında KONT grubuna göre düşüş meydana gelmektedir ( $p < 0.05$ -ANOVA). 1670/1640 ve 1245/1270 kemik dokudaki kollajen sarmal yapıda meydana gelen bozukluğu göstermektedir. Bu değerlerde meydana gelen artış kollajen sarmal yapısında meydana gelen hasarı göstermektedir. Elde edilen verilere göre OVX ve KMA kemik dokunun mineral matriks oranını düşürürken, kollajen sarmal yapısını da bozmaktadır. Sonuçlar Şekil 4.6. da gösterilmiştir.

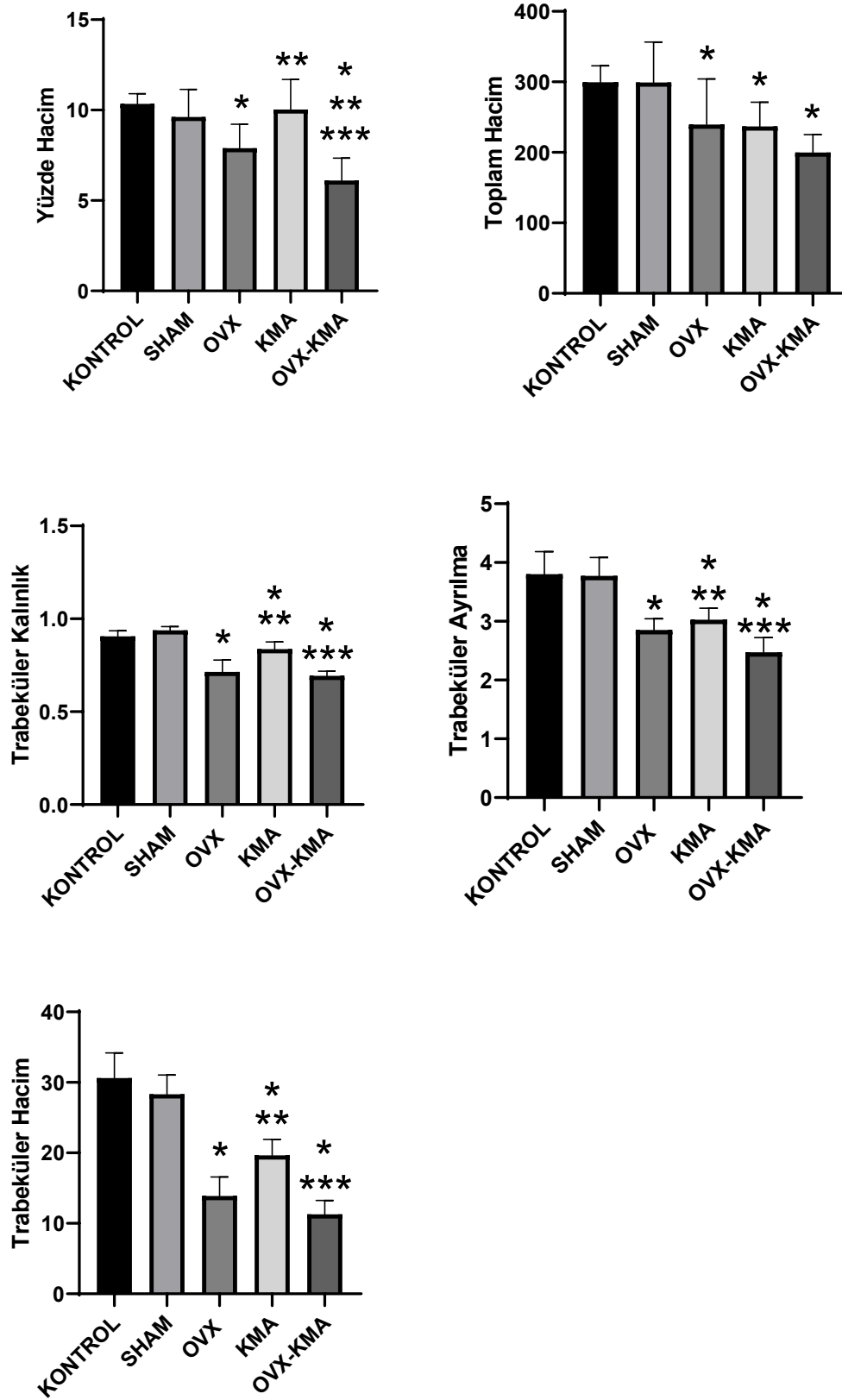


**Şekil 4.6** Fosfat/Amide1, Fosfat/Amide3, Fosfat/Prolin, Kristalleşme Hidroksiprolin/Prolin, 1670/1640, 1670/1690, 1245/1270 değerlerinin gösterilmesi ( \* Kontrol, \*\* OVX, \*\*\* KMA grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır p<0.05).

#### 4.6. Mikro-BT Görüntülemeleri ve Analizleri Bulguları

Mikro-BT ile Yüzde Hacim, Toplam Hacim, Trabeküler Kalınlık, Trabeküler Ayrılma ve Trabeküler Hacim değerleri ölçülmüştür. Yüzde Hacim değerlerinin istatistiksel olarak analizi yapıldığında OVX grubunda Yüzde Hacim değeri KONT ve KMA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ( $p < 0.0001$ ). KMA grubuna bakıldığında ise bu grubun Yüzde Hacim değerinin OVX ve OVX-KMA gruplarına göre anlamlı oranda yüksek olduğu ve bu grupta oluşan deformasyonun OVX ve OVX-KMA gruplarına göre daha az meydana geldiği yorumlanabilir ( $p < 0.0001$ ). Öte yandan OVX-KMA grubunun Yüzde Hacim değeri KONT, OVX ve KMA gruplarından istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olarak tesbit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ). Toplam Hacim değeri kemiğin mineral yapısını ve yoğunluğunu gösteren önemli bir veridir. Bu değer istatistiksel olarak değerlendirilmesinde OVX, KMA ve OVX-KMA grubunun Toplam Hacim değerinin KONT grubuna göre anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir ( $p < 0.0001$ ). Trabeküler Kalınlık değerlerinin istatistiksel olarak analizi yapıldığında OVX grubunda Trabeküler Kalınlık değeri KONT ve KMA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ( $p < 0.0001$ ). KMA grubunda ise bu grubun Trabeküler Kalınlık değerinin KONT grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu; öte yandan OVX ve OVX-KMA gruplarına göre anlamlı oranda yüksek olduğu ve bu grupta oluşan deformasyonun OVX ve OVX-KMA gruplarına göre daha az meydana geldiği yorumlanabilir ( $p < 0.0001$ ). OVX-KMA grubunun Trabeküler Kalınlık değerinin KONT ve KMA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ( $p < 0.0001$ ). Trabeküler Ayrılma değerlerinin istatistiksel olarak analizi yapıldığında OVX grubunda Trabeküler Ayrılma değeri KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlenirken OVX-KMA grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. OVX-KMA grubunda OVX'e göre daha fazla yıkım meydana geldiğini yorumlanabilir ( $p < 0.0001$ ). KMA grubunda ise Trabeküler Ayrılma değeri KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlenirken OVX-KMA grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. KONT grubuna göre yıkımın fazla olduğu ama OVX-KMA grubuna göre daha az yıkım olduğu yorumlanabilir ( $p < 0.0001$ ). Öte yandan OVX-KMA grubunda Trabeküler Ayrılma değeri KONT, SHAM, OVX ve KMA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Bu durumda en fazla yıkımın OVX-KMA grubunda meydana geldiği yorumlanabilir ( $p < 0.0001$ ). Trabeküler Hacim değerlerinin istatistiksel olarak

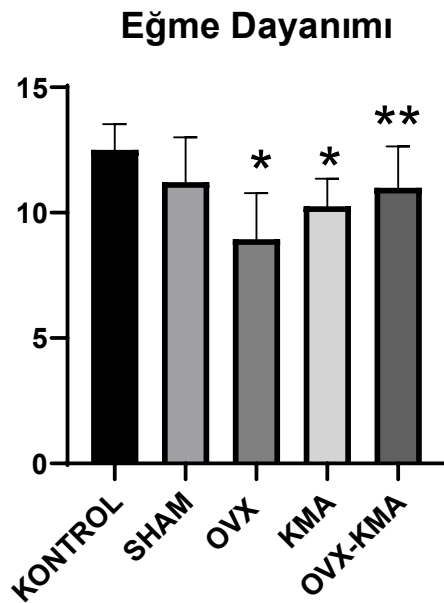
analizi yapıldığında OVX grubunun KONT ve KMA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı gözlemlenirken OVX-KMA grubu ile aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p < 0.0001$ ). KMA grubunda ise Trabeküler Hacim değeri KONT grubuna göre anlamlı olarak azalırken OVX ve OVX-KMA gruplarına göre anlamlı olarak artmış olduğu görülmüştür. KMA grubunda KONT grubuna göre daha fazla yıkım meydana gelirken OVX ve OVX-KMA gruplarına göre daha az yıkım olduğu yorumlanabilir ( $p < 0.0001$ ). OVX-KMA grubunun trabekular volume değeri istatistiksel olarak KONT ve KMA gruplarından daha düşüktür ( $p < 0.0001$ ). Yapılan ölçümler Şekil 4.7. de gösterilmiştir. Tüm bu değerlere bakıldığında KMA kemik dokunun kütleinde kayba neden olurken aynı zamanda kemik dokunun hacminde ve kalınlığında azalmaya sebep olmaktadır.



**Şekil 4.7** Yüzde Hacim, Toplam Hacim, Trabeküler Kalınlık, Trabeküler Ayrılma ve Trabeküler Hacim değerlerinin gösterilmesi (\* Kontrol, \*\* OVX, \*\*\* KMA grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır  $p < 0.05$ ).

#### 4.7. Biyomekanik Test (Üç Nokta Eğme Testi) Bulguları

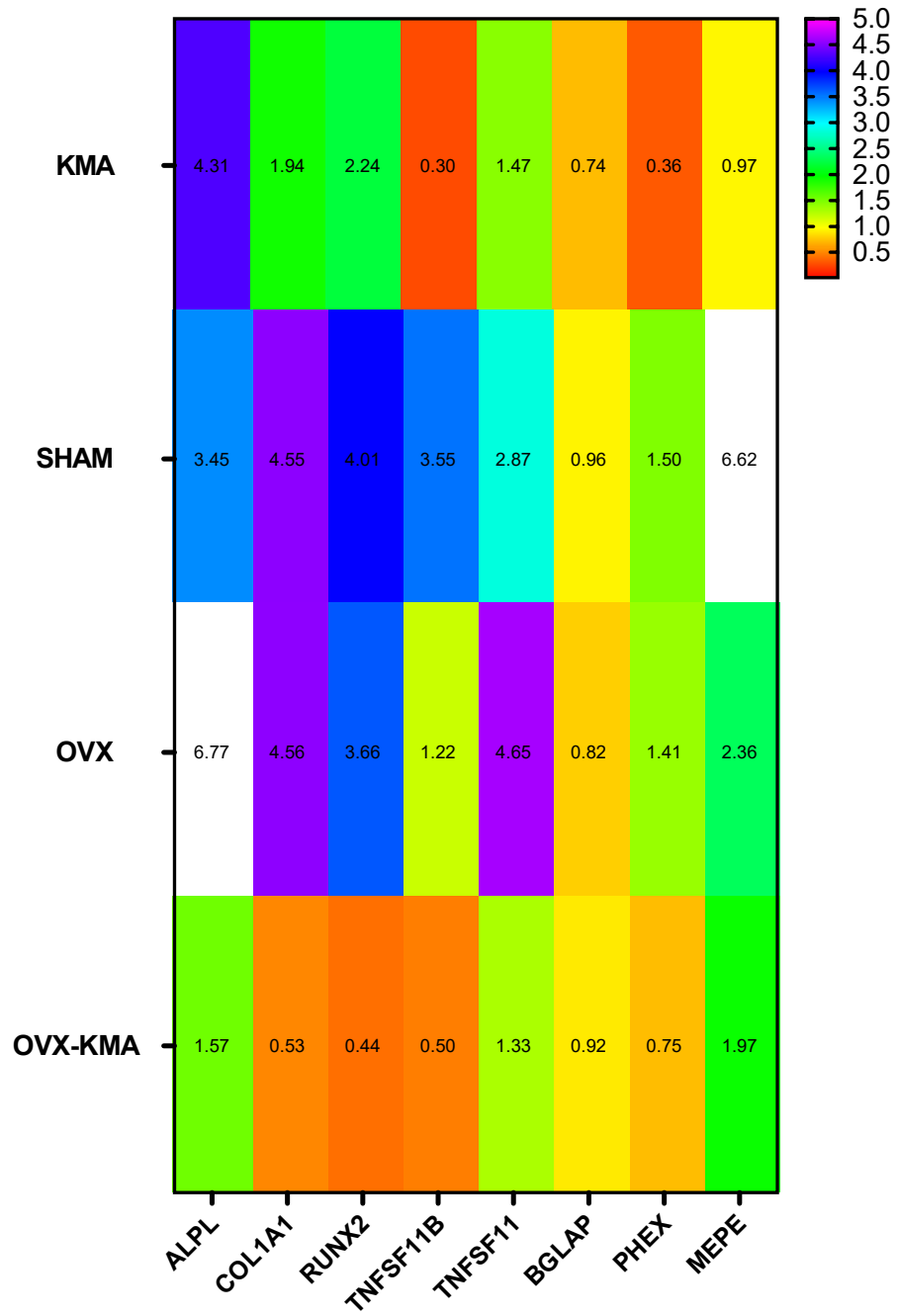
Biyomekanik testler sonucunda elde edilen sonuçlara göre OVX ve KMA grubunun eğme dayanımı değeri kemikte oluşan harabiyetten dolayı KONT grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. Öte yandan OVX-KMA grubunun eğme dayanımı değeri KONT grubuna göre düşük bulunmuşken OVX ve KMA grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $p < 0.005$ ). İstatistik sonuçlarına göre OVX ve KMA gruplarında diğer gruplara göre kemik dokunun fiziko-kimyasal yapısında hasar meydana getirdiği, OVX-KMA grubunun ise sadece KONT grubuna karşı hasar meydana getirdiği görülmüştür. Ancak OVX-KMA grubunda OVX ve KMA'ya göre daha az hasar meydana getirmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8. de gösterilmiştir.



**Şekil 4.8** Eğme Dayanımı Sonuçlarının Gösterilmesi ( \* Kontrol, \*\* OVX, \*\*\* KMA grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır  $p < 0.05$ ).

#### 4.8. RT-PCR Deneyleri Bulguları

Tüm gruplarda metabolik asidoz modelinin (ALPL, COL1A1, TNFSF11 (RANKL), TNFSF11B (OPG), BGLAP, Runx 2, PHEX ve MEPE) mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimleri incelenmiştir. Tüm proteinlerin ortalamaları alınarak heatmap (ısı haritası) ile incelenmiştir. İncelemeler sonucunda KMA, SHAM, OVX ve OVX-KMA grupları birbiri ile karşılaştırılmıştır. ALPL' ye bakıldığında SHAM grubuna göre KMA ve OVX grubunda artış meydana gelirken OVX-KMA grubunda azalma meydana gelmiştir ( $p<0.005$ ). COL1A1 seviyelerine bakıldığında ise SHAM ve OVX grubuna göre KMA ve OVX-KMA grubunda anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir ( $p<0.005$ ). Runx2 değerlerinde ise KMA grubunda SHAM ve OVX grubuna göre düşüş görülmüştür. OVX-KMA tüm gruplara göre anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir ( $p<0.005$ ). TNFSF11B (OPG) değerlerinde SHAM grubuna göre KMA, OVX ve OVX-KMA gruplarında anlamlı bir düşüş görülmüştür ( $p<0.005$ ). TNFSF11 (RANKL) sonuçlarına bakıldığında SHAM grubuna göre KMA ve OVX-KMA grubunda düşüş görülürken OVX grubunda artış meydana gelmiştir ( $p<0.005$ ). BGLAP değerinde ise anlamlı bir fark bulunamamıştır. PHEX sonuçlarına bakıldığında SHAM grubuna göre KMA ve OVX-KMA grubunda azalma meydana gelirken OVX grubunda bir fark görülmemiştir ( $p<0.005$ ). MEPE değerlerine baktığımızda SHAM grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir ( $p<0.005$ ). Tüm protein ekspresyonlarına baktığımızda KMA'nın kemik harabiyetine sebep olduğu görülmüştür. Buna ek olarak OVX varlığında KMA daha fazla harabiyete sebep olmaktadır. Elde edilen veriler Şekil 4.9. da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 RT-PCR Deney Sonuçlarının Isı Haritası ile Gösterilmesi



## 5. TARTIŞMA

Yapılan son çalışmalar gösteriyor ki kronik böbrek yetmezliği, diyare ve ilaç kullanımı kronik metabolik asidoza sebep olabilmektedir. KMA'ya bağlı olarak vücuttaki asit-baz dengesi bozulmaktadır. Bu dengenin korunmasını sağlayan en önemli etken kemik dokudur. Kemik doku KMA'ya bağlı olarak yıkıma uğramaktadır. Yapılan çalışmalarda KMA'nın kronik böbrek hastalığı sonrasında ortaya çıkabilecek bir metabolik problem olduğu ortaya konmuştur. KMA'nın kemik dokuda yarattığı hasar tüm yönüyle ifade edilememiştir.

Literatürde overektomi modeli ve kronik metabolik asidoz (KMA) modelinin birlikte uygulandığı ve bunun kemik doku üzerindeki etkilerini Mikro-BT yöntemi ile kemik mimarinin nasıl etkilendiği gösteren bir çalışma bulunmaktadır (Gasser vd 2014). Gasser ve ark. yaptığı çalışmada Mikro-BT yöntemi kullanılarak, overektomi ve kontrol gruplarında 15 mEq NH<sub>4</sub>Cl ile indükledikleri KMA'nın kortikal kemik kütlelerinde azalmaya sebep olduğu ve trabeküler sayıda azalma ile karakterize kemik mikro yapısında bozulmaların ortaya çıktığı gösterilmiştir (Gasser vd 2014). Literatürde kronik metabolik asidoz (KMA) modelinin kemik dokuda yarattığı etkileri gösteren çalışmalar da mevcuttur. Assapun ve ark. da %1,5 NH<sub>4</sub>Cl ile indükleyerek KMA modeli oluşturdukları sıçanlarda Mikro-BT incelemeleri yaparak kemik mineral yoğunluğunda, trabekül sayılarında ve kalınlıklarında azalmayı göstermişlerdir (Assapun vd 2009). Kraut ve ark. metabolik asidozun kemik kaybını artırdığını, kemik oluşumunu bozduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında metabolik asidozun osteopeniye neden olacağını ancak osteomalazinin metabolik asidozun doğrudan sonucu olmadığını bildirmişlerdir (Kraut vd 1986). Benzer şekilde Han ve ark. overektominin kortikal alan ve kortikal kalınlığı azaltmada etkili olduğunu, bunun yanında femur kemiğinin bükülme gücünün önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (Han vd 1998). Donmez ve ark. tarafından overektomi

yapılan sıçanlarda kemik mineral yoğunluğunun, kemik kuvvet dayanıklılığının, enerji absorbe kapasitesinin azaldığı ve benzer şekilde trabeküllerin zayıfladığı gösterilmiştir (Donmez vd 2012). Yukarıda açıklandığı üzere hem KMA hem de overektomi modeli kemik dokuda ağır tahribat yaratmaktadır. Fakat yapılan son çalışmalara bakıldığında overektomi modelinde oluşturulan KMA' nın kemik doku üzerinde yarattığı tahribatı ortaya koyan çalışmalarda KMA tek bir yönden incelenip başka yöntemler ile çalışılmamıştır.

Yukarıda açıklanan çalışmalardan farklı olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada KMA ve OVX modelinin kemik yapım ve yıkımına etki eden proteinlerin (ALPL, COL1A1, TNFSF11, TNFSF11B, BGLAP, Runx 2, PHEX ve MEPE) ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle, mineral ve organik matriks oranları Raman spektroskopisi yöntemiyle ortaya koyulmuştur. Bununla birlikte Mikro-BT ve biyomekanik testlerle kemik dokunun makro yapısındaki değişiklikleri göstererek osteoporotik aktivitedeki artışın nedenini ortaya koymak istedik.

Bunlara ek olarak (TOS) ve (TAS) analiziyle metabolik asidoza maruz kalan kemik dokunun oksidatif ve antioksidatif seviyelerindeki değişimleri, serum osteokalsin ve alkalin fosfataz ölçümleri ile kemik dokuda metabolik asidozun yarattığı tahribatı göstererek her bir parametrede oluşan hasarları bütüncül bir bakış açısıyla ortaya koymayı planladık. Projemizin elde edilecek sonuçlar ışığında her iki patolojinin kemik dokuda yaratmış olduğu tahribatı ortaya koyarak tedavi amaçlı çalışmalar için önemli bir altyapı oluşturacağını düşünmekteyiz.

Planladığımız çalışmada en önemli parametre deneklerde KMA oluşturulabilmesidir. Bunun için literatürde uygulanan KMA modeli kullanılmıştır. Deneklere gavaj yoluyla NH<sub>4</sub>Cl verilmiştir. KMA oluştuğunu görebilmek için deney sonunda deneklerden arteriyel kan alınıp kan gazı analizi yapılmıştır. Gasser ve ark. yapmış olduğu çalışmada NH<sub>4</sub>Cl uygulaması KMA ile uyumlu olacak şekilde kan pH' ında önemli bir azalma görülüp HCO<sub>3</sub> seviyesinde yaklaşık 10 mmol/l' lik bir düşüş meydana gelmiştir (Gasser vd 2014). Assapun ve ark. yapmış olduğu çalışmada KMA grubu sıçanların pH' ı kontrol grubundakilerden önemli derecede düşük bulunmuştur. KMA grubu sıçanların pH' ı yaklaşık olarak 7.3 bulunmuştur (Assapun vd 2009). JM Whittamore ve ark. yapmış olduğu çalışmada kontrol grubunun pH değeri 7.44 ± 0.01 HCO<sub>3</sub> değeri 28.0 ± 1.0 iken asidoz grubunun pH değeri 7.33 ± 0.03 HCO<sub>3</sub> değeri 21.6 ± 1.6 bulunmuştur (Whittamore ve Hatch 2015). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise pH değerinde yaklaşık 0.15 düşüş görülürken HCO<sub>3</sub> değerinde ise yaklaşık 8 mmol/l

düşüş meydana gelmiştir. Bu durum gösteriyor ki uygulanan KMA modeli literatürle karşılaştırıldığında başarılı bir şekilde sonuç vermiştir.

Gasser ve ark. yapmış olduğu çalışmada deneklerin kg' ları 6. ve 10. Hafta ölçülmüş olup sonuçlara bakıldığında OVX grubunda bulunan hayvanların değerleri diğer grupların değerlerine göre daha fazla artış meydana gelmiştir. Bizim çalışmamızda ise tüm grupların ağırlıkları her iki haftada bir olacak şekilde ölçülmüştür. OVX-KMA grubunda bulunan hayvanların değerleri diğer grupların değerlerine göre daha fazla artış meydana gelmiştir. Literatüre baktığımız zaman KMA üzerine yapılan çalışmalarda kilo ölçümüne yeteri kadar değinilmemiştir.

Arsyad ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada uzun süreli ketojenik diyet uygulanan hayvanlarda KMA meydana gelmiştir. Deneklerde TAS değerlerine bakılmıştır ve uzun süreli ketojenik diyetin TAS değerini düşürdüğü bulunmuştur (Arsyad vd 2020). Rustom ve ark. yapmış olduğu çalışmada kronik böbrek yetmezliğine bağlı KMA meydana gelmektedir. Meydana gelen asidoz durumu TOS değerini artırmıştır (Rustom vd 2003). Wesson ve ark. yapmış olduğu çalışmada KMA' nın kronik böbrek hastalığında ilerleyici yönde bir risk faktörü olup olmadığını araştırmışlardır. Hastalarda KMA'nın düşük TAS seviyesine neden olduğu ve TOS seviyesini artırdığı gözlemlenmiştir (Wesson vd 2020). Altındağ ve ark. yapmış olduğu çalışmada osteoporoz olan kişiler ile sağlıklı kişilerin TAS, TOS ve OSI değerleri birbiri ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlarda osteoporoz olan kişilerde TOS ve OSI değeri artarken TAS değerinin düştüğü gözlemlenmiştir (Altindag vd 2008). Bizim yaptığımız çalışmaya bakıldığında TAS değerinin OVX-KMA grubunda diğer gruplara göre düştüğü görülmektedir. TOS seviyelerine bakıldığı zaman KMA ve OVX-KMA grubunda KONT grubuna göre artış görülmektedir. OSI değerine bakıldığı zaman ise KMA, OVX ve OVX-KMA olan gruplarda artış olduğu görülmektedir. Elde ettiğimiz veriler literatüre uyum göstermektedir. Literatürde ve çalışmamızda gösterildiği üzere OVX ve KMA işlemlerine maruz kalan hayvanlarda oksidan stres seviyesi artmaktadır.

Stepan ve ark. yapmış olduğu klinik bir çalışmada ooferektomi olan primer hiperparatiroidizmi olan kadın hastaların serum alkalin fosfataz ve osteokalsin değerleri incelenmiştir. Deneklerde serum ALP ve OC değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir (Stepan vd 1987). Singh ve ark. yapmış olduğu çalışmada osteoporoz olan kadınlarda serum alkalin fosfataz ve osteokalsin değerlerine bakmışlardır. Ortaya çıkan sonuçlara göre osteoporozlu olan grubun serum seviyeleri kontrol grubuna göre artmıştır (Singh vd 2015). Atalay ve ark. yapmış olduğu çalışmada menapoz öncesi ve sonrası kadınlarda serum alkalin fosfataz ve osteokalsin değerlerine bakılmış; ek olarak normal, osteopeni

ve osteoporoz olan gruplarda serum değerleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre serum ALP ve OC seviyeleri menapoz öncesi grup ve normal gruba göre artmıştır (Atalay vd 2012). Gasser ve ark. yapmış olduğu çalışmada SHAM, KMA, OVX ve OVX-KMA grupları serum osteokalsin seviyeleri açısından karşılaştırılmıştır. OVX grubundaki hayvanların serum osteokalsin seviyeleri artmıştır. Asidoz olan gruplarda olmayanlara göre bir düşüş görülmüştür (Gasser vd 2014). Bizim yaptığımız çalışmada KMA, OVX ve OVX-KMA gruplarında serum ALP ve OC seviyeleri artmıştır. Gasser ve ark. yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde OVX-KMA grubunun serum seviyeleri OVX grubuna göre düşmüştür. Bulmuş olduğumuz sonuçlara göre OVX ve KMA modelleri serum ALP ve OC seviyelerini yükseltmektedir. Serum seviyelerinin artması da kemik dokudaki osteoporozu işaretler.

Wu ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada OVX yapılmış sıçanlar Mikro-BT açısından incelenmiştir. Elde edilen verilere göre osteoporozu maruz kalan deneklerde Yüzde Hacim, Toplam Hacim, Trabeküler Kalınlık ve Trabeküler Hacim değerlerinde düşüş meydana gelirken Trabeküler Ayrılma değerlerinde artış meydana gelmiştir (Wu vd 2015). Brouwers ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada OVX uygulanan sıçanlarda in vivo şekilde Mikro-BT bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Wu ve ark.'nın sonuçlarını destekler şekildedir. Bu sonuçlar gösteriyor ki OVX kemik dokuda hasara neden olup kemik mikro mimarisini bozmaktadır (Brouwers vd 2009). Gasser ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada KMA'ya maruz kalmış denekler mikro-BT açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre KMA'ya maruz kalan deneklerin trabeküler hacim, toplam kemik hacmi ve trabekül sayısında ortaya çıkan azalma ile kemik mikro mimarisinin bozulduğunu bildirmişlerdir (Gasser vd 2014). Li ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada postmenopozal osteoporozlu sıçanlarda kemik dokunun mikro mimarisi mikro-BT ile incelenmiştir. İncelemeler sonucunda osteoporozu maruz kalan kemiklerde trabeküler hacim, toplam kemik hacmi ve trabekül sayısında azalma meydana gelirken trabeküler boşluk artmıştır (Li vd 2022). Bizim çalışmamızda ise KMA'ya ve OVX'e maruz kalan deneklerde Yüzde Hacim, Toplam Hacim, Trabeküler Kalınlık, Trabeküler Ayrılma ve Trabeküler Hacim değerleri azalmıştır. Bu sonuçlara göre KMA ve OVX modelleri kemik mikro mimarisini bozup yıkıma neden olmaktadır. Literatüre bakıldığında osteoporoz görülen kemik dokuda Yüzde Hacim, Toplam Hacim, Trabeküler Kalınlık ve Trabeküler Hacim değerlerinde düşüş meydana gelirken Trabeküler Ayrılma değerlerinde artış meydana gelmiştir. Ancak bizim çalışmamızda Trabeküler Ayrılma değerlerinde artış meydana gelmemiştir. Kemik'in tamamında bir kayıp meydana geldiği için boşluklar oluşmamış olabilir. Ancak bu durumun daha iyi açıklanabilmesi için bu konuda daha çok çalışma yapılmalıdır.

Kemik dokuda meydana gelen hasar sadece osteoporoz olarak değerlendirilmemelidir. Kemiğin fiziksel özelliklerinin yanında kalitesi de değerlendirilmelidir. Yapılan Raman ölçümleri ile kemik dokuda bulunan Fosfat, Amide 1, Amide 3, Prolin, Hidroksiprolin değerleri ölçülüp Fosfat/Amide1, Fosfat/Amide3, Fosfat/Prolin, Kristalleşme, Hidroksiprolin/Prolin, 1670/1640, 1670/1690, 1245/1270 oranlarına bakılmıştır. Bu oranlar kemik dokunun kalitesi hakkında bilgi vermektedir (Unal vd 2019). Fosfat/Amide1, Fosfat/Amide3, Fosfat/Prolin, Kristalleşme, Hidroksiprolin/Prolin bu değerler bize mineral-matriks oranı hakkında bilgi verirken 1670/1640, 1670/1690, 1245/1270 değerleri ise organik matriks özellikleri hakkında bilgi vermektedir (Unal 2021). Orkoula ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada osteoporoz uygulanan sıçanların tibia kemikleri Raman spektroskopisi ile incelenmiştir. İnceleme sonucuna göre mineral çözünmesine kıyasla önemli ölçüde artan kollajen dönüşümü nedeniyle mineral-matriks oranında azalma meydana gelmiştir (Orkoula vd 2012). Paschalis ve ark. gerçekleştirdiği çalışmaya göre 1670/1690 oranı kemik dokudaki Amid1 seviyesini oluşturan bantlardandır ve kollajen seviyesinde ortaya çıkan azalmanın etkisi ile 1670 seviyesi azalırken 1690 seviyesi artmaktadır. Bu durumda 1670/1690 seviyesi kollajen kaybına bağlı olarak düştüğü bulunmuştur (64). Unal ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada kemik dokudaki kollajen miktarını gösteren Amide 1 ve Amide 3 değerlerinin alt parametreleri olan 1670/1640 ve 1245/1270 değerleri çalışılmıştır. Bu değerlerin artması kollajen sarmal yapısındaki daha düşük düzenli yapıyı göstermektedir. Kemik dokuda meydana gelen hasar kollajendeki üçlü sarmal yapıyı bozmaktadır bu durumda da 1670/1640 ve 1245/1270 değerlerinde artış meydana gelmektedir (Unal vd 2016). Flanagan ve ark. yapmış olduğu çalışmaya göre kollajende meydana gelen denatürasyona bağlı olarak 1670/1640 değerinde artış meydana gelmektedir (Flanagan vd 2017). Bizim yaptığımız çalışmada ise KMA ve OVX modeline maruz kalan kemik dokunun kalitesinde meydana gelecek değişimin gözlenmesi amacıyla Raman spektroskopisi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre Fosfat/Amide1, Fosfat/Amide3, Fosfat/Prolin, Kristalleşme, Hidroksiprolin/Prolin değerlerinde düşüş meydana gelmiştir. Bu düşüş kemik dokunun mineral-matriks oranında düşüşü göstermektedir. Bunun yanı sıra 1670/1690 değerlerinde de aynı etki görülüp düşüş görülmektedir. Bu durum da kemik dokuda kollajen kaybının olduğunu göstermektedir. 1670/1640 ve 1245/1270 değerlerinde ise artış görülmüştür. Bu değerler kollajen sarmal yapısındaki bozulmayı göstermektedir. Tüm Raman sonuçlarına bakıldığında KMA ve OVX kemik dokunun hem mineral-matriks yapısını hem de kollajen sayısını ve yapısını bozmaktadır.

Dönmez ve ark. 75 adet sıçan kullanarak yapmış olduğu çalışmada OVX' in kemik dokudaki hasarına ve Losartan'ın bu hasarı ne kadar tedavi edici etkisine bakmışlardır. Verilen hasar biyomekanik yönden incelenmiştir. Elde edilen verilere göre OVX olan grupta diğer gruplara göre flexural strength (eğme dayanımı) azalmıştır (Donmez vd 2012). Bu da kemiğe uygulanan kuvvete kemiğin daha az dayandığını ve kemik hasarının oluştuğunu göstermektedir. Bonetto ve ark. yapmış olduğu çalışmada sıçanlarda femur kırığı oluşturulmuş ve normal iyileşme ve alendronat kullanılarak iyileşme incelenmiştir. Yapılan çalışmada yaşlı ve genç sıçanlarda kullanılarak kemik doku biyomekanik olarak incelenmiştir. Elde edilen verilere göre tedaviden bağımsız yaşlı olan grubun flexural strength (eğme dayanımı) değeri genç gruba göre düşük bulunmuştur (Bonetto vd 2021). Gugala ve ark. yapmış olduğu çalışmada 10 gün boyunca mekanik ventilasyon uygulanan sıçanlarda femurda meydana gelen kemik kaybı oranını ve yapıdaki bozulmayı biyomekanik yönden incelemiştir. Elde edilen verilere göre uzun süreli mekanik ventilasyon flexural strength (eğme dayanımı) düşüşüne sebep olmaktadır (Gugala vd 2021). Amanat ve ark. yapmış olduğu çalışmada sıçanlarda kırık sonrası flexural strength (eğme dayanımı) azaldığını göstermiştir (Amanat vd 2007). Bizim yaptığımız çalışmada OVX ve KMA gruplarında flexural strength (eğme dayanımı) değeri KONT grubuna göre düşük bulunmuştur. OVX-KMA grubunda ise OVX ve KMA grubuna göre yüksek KONT grubuna göre düşük bulunmuştur ( $p < 0.005$ ). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki kemik dokuda meydana gelen kırık, overektomi, yaşa bağlı hasar ve immobilizasyona bağlı hasar biyomekanik olarak incelendiğinde flexural strength (eğme dayanımı) değeri düşmektedir. Bizim çalışmamızda uyguladığımız KMA modeli de diğer çalışmalarda meydana geldiği gibi kemik dokunun kuvvet karşısında eğme dayanımında azalmaya sebep olmuştur.

Balla ve ark. yapmış olduğu çalışmada postmenopozal osteoporotik olan ve olmayan hastalardan kemik doku örneği alarak 87 gen ekspresyonu üzerinde inceleme yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre osteoporoza maruz kalan kemik dokuda ALPL ve COL1A1 değerlerinde düşüş meydana gelmiştir. Bu düşüş azalmış kemik oluşumunu ve kemik gücünü göstermektedir. (Balla vd 2008). Cao ve ark. yapmış olduğu çalışmada yaşa göre kemik doku belirteçleri olan RANKL, OPG, COL1A1, ALPL ve OC ekspresyon seviyelerini ölçmüşlerdir. Ölçümler sonucunda ALPL ve COL1A1 seviyelerinde yaşa bağlı azalma görülüp OC seviyelerinde değişim görülmemiştir. Öte yandan RANKL seviyesinde yaşa bağlı artış olurken OPG seviyelerinde yaşa bağlı azalma meydana gelmiştir. Bu durum da yaşa bağlı olarak kemik kalitesinde bozulma ve yıkımın arttığını göstermektedir (Cao vd 2003). Tanaka ve ark. yapmış olduğu çalışmada 6 aylık ve 24 aylık sıçanlar alınarak kemik dokunun biyobelirteçleri olan COL1A1, ALPL, OP ve OC

seviyelerine bakılmıştır. Sonuçlara göre yaşa bağlı olarak ekspresyon seviyeleri azalmaktadır (Tanaka vd 2002). Pathak ve ark. yapmış olduğu çalışmada Romatoid Artrit'e maruz kalmış hastaların RANKL, OPG, PHEX ve MEPE değerleri 0. ve 7. gün ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre kemik dokuda osteosit oluşumunu ve mineralizasyonu sağlayan PHEX ve MEPE değerleri azalmıştır. Diğer yönden RANKL ve OPG değerlerinde artış meydana gelmiştir. Bu durum kemik dokuda meydana gelen hasara bağlı olarak PHEX ve MEPE değerlerinde düşüş RANKL ve OPG değerlerinde artış meydana geldiğini göstermektedir (Pathak vd 2016). Cabral ve ark. yapmış olduğu çalışmaya göre kemik dokuya özgü belirteçler kemik dokuda meydana gelen hasarın tespit edilmesi ve tedavi edilmesi için önemli bir avantaj sağlamaktadır (Cabral vd 2016). Hu ve ark. yapmış olduğu çalışmada Runx2, BGLAP ve COL1A1 genlerin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Osteoporozu tedavi edici etken madde verildikten sonra Runx2, BGLAP ve COL1A1 genlerin ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelmiştir (Hu vd 2019). Bizim yaptığımız çalışmada ise ALPL seviyesi OVX-KMA grubunda SHAM grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir ( $p < 0.005$ ). Bu düşüş kemik yapımında meydana gelen azalma ile karakterizedir. COL1A1 seviyesine bakıldığı zaman SHAM ve OVX grubuna göre KMA ve OVX-KMA gruplarında anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir ( $p < 0.005$ ). COL1A1 seviyelerinde meydana gelen düşüş kemik dokunun en önemli fibril ve yapı maddesinin azalmasını göstermektedir. KMA' ya maruz kalan kemik dokuda COL1A1 seviyesi azalmıştır ( $p < 0.005$ ). Buna ek olarak Runx2 seviyeleri ele alındığında SHAM ve OVX gruplarına göre KMA ve OVX-KMA grubunda anlamlı bir düşüş vardır ( $p < 0.005$ ). Runx2 osteoblast farklılaşmasını sağlamaktadır. Runx2 seviyelerindeki azalma farklılaşmanın olmadığını göstermektedir. TNFSF11(OPG) seviyelerinde ise SHAM grubuna göre OVX grubunda artış KMA ve OVX-KMA grubunda azalma meydana gelmiştir ( $p < 0.005$ ). TNFSF11(OPG), RANKL'ı bağlayarak osteoklast gelişimini engellemektedir. PHEX değeri OVX ve SHAM grubuna göre KMA ve OVX-KMA grubunda anlamlı bir düşüş göstermiştir ( $p < 0.005$ ). MEPE değerlerinde ise SHAM grubuna göre OVX, KMA ve OVX-KMA gruplarında azalma meydana gelmiştir ( $p < 0.005$ ). PHEX ve MEPE kemik dokuda osteosit oluşumunu sağlamaktadır. Meydana gelen bu azalma kemik dokuda yıkım olduğunu göstermektedir. Tüm ölçülen kemik doku biyobelirteçlerine bakıldığında KMA' ya maruz kalan kemik dokuda yıkım biyobelirteçleri artarken yapım biyobelirteçleri azalmıştır. Buna bağlı olarak da kemik dokuda hasar meydana getirdiği görülmektedir.

## 6. SONUÇ

Bizim yaptığımız çalışmada kemik doku hasarına sebep olan OVX ve KMA modeli uygulanıp bu iki model karşılaştırılmıştır. Bu hasar modellerinden elde edilen sonuçlara göre TAS seviyeleri azalıp TOS ve OSI seviyeleri artmıştır. Bunun yanı sıra Serum ALP ve OC seviyeleri artmıştır. Raman analizlerine kemik dokunun minerak ve matriks değerleri hakkında bilgi veren Fosfat/Amide1, Fosfat/Amide3, Fosfat/Prolin, Kristalleşme, Hidroksiprolin/Prolin ve 1670/1690 değerleri azalırken 1670/1640 ve 1245/1270 değerlerinde artış görülmüştür. Mikro-BT sonuçlarına göre kemik dokunu hacminde ve kalınlığında azalma meydana gelmiştir. Biyomekanik test sonuçlarına göre eğme dayanımı azalmıştır. RT-PCR sonuçlarına göre kemik dokunun biyobelirteçleri incelenip kemik yıkımında görevli gen (RANKL ve RANK) ekspresyonları artarken kemik yapımında görevli (ALP, OC, Runx2, Tip 1 kollajen, OPG) gen ekspresyonları azalmıştır.

Elde edilen sonuçlar gösteriyor ki KMA ve OVX kemik dokuda tahribat yaratarak kemik dokunun biyomekanik, fiziko-kimyasal ve mikromimari yapısını bozmuştur. Ortaya çıkan veriler literatürü destekleyerek ilerde yapılacak olan çalışmalara alt yapı oluşturacak aynı zamanda bu konuda yapılacak tedavi edici girişimlere yol gösterecektir.



## 7. KAYNAKLAR

Altindag, Ozlem, et al. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology International*, 2008, 28.4: 317-321.

Amanat, Negin, et al. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2007, 22.6: 867-876.

Antoniucci, Diana M. et al. Postmenopausal bilateral oophorectomy is not associated with increased fracture risk in older women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2005, 20.5: 741-747.

Arsyad, Aryadi, et al. Long-term ketogenic diet induces metabolic acidosis, anemia, and oxidative stress in healthy wistar rats. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2020, 2020.

Aryal, Dinesh, et al. Chronic metabolic acidosis elicits hypertension via upregulation of intrarenal angiotensin II and induction of oxidative stress. *Antioxidants*, 2020, 10.1: 2.

Assapun, Jenjira; CHAROENPHANDHU, Narattaphol; KRISHNAMRA, Nateetip. Early acceleration phase and late stationary phase of remodeling imbalance in long bones of male rats exposed to long-standing acidemia: a 10-month longitudinal study using bone histomorphometry. *Calcified Tissue International*, 2009, 85.1: 1-9.

Atalay, Sacide, et al. Diagnostic utility of osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin, and alkaline phosphatase for osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. *Annals of Laboratory Medicine*, 2012, 32.1: 23-30.

Balla, Bernadett, et al. Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcified Tissue International*, 2008, 82.1: 12-26.

Bayliss, Lee; MAHONEY, David J. MONK, Paul. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)*, 2012, 30.2: 47-53.

Bonetto, Luana Mordask, et al. Effect of Age and Sodium Alendronate on Femoral Fracture Repair: Biochemical and Biomechanical Study in Rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 1145.

Boskey, Adele L.; POSNER, Aaron S. Bone structure, composition, and mineralization. *The Orthopedic Clinics of North America*, 1984, 15.4: 597-612.

Brouwers, J. E. M. et al. Effects of PTH treatment on tibial bone of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-CT. *Osteoporosis International*, 2009, 20.11: 1823-1835.

Bushinsky, DA. 1994. Acidosis and bone. *Miner. Electrolyte Metab.* 20:40-52.

Cabral, Hebert Wilson Santos, et al. The use of biomarkers in clinical osteoporosis. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2016, 62: 368-376.

- Cao, Jay, et al. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. ***Journal of Bone and Mineral Research***, 2003, 18.2: 270-277.
- Clarke, Bart. Normal bone anatomy and physiology. ***Clinical Journal of the American Society of Nephrology***, 2008, 3.Supplement 3: S131-S139.
- Comelekoglu, Ulku, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. ***Clinical Rheumatology***, 2007, 26.3: 380-384.
- Donmez, Baris Ozgur, et al. Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs. ***Pharmacological Reports***, 2012, 64.4: 878-888.
- Downey, Patricia A.; SIEGEL, Michael I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. ***Physical Therapy***, 2006, 86.1: 77-91.
- Egermann, Marcus; GOLDHAHN, Jrg; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. ***Osteoporosis International***, 2005, 16.2: S129-S138.
- Flanagan, Christopher D. et al. Raman spectral markers of collagen denaturation and hydration in human cortical bone tissue are affected by radiation sterilization and high cycle fatigue damage. ***Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials***, 2017, 75: 314-321.
- Florencio-silva, Rinaldo, et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. ***BioMed Research International***, 2015, 2015.
- Frick, Kevin K. et al. Metabolic acidosis increases intracellular calcium in bone cells through activation of the proton receptor OGR1. ***Journal of Bone and Mineral research***, 2009, 24.2: 305-313.
- Gasser, Jürg A. et al. Effect of chronic metabolic acidosis on bone density and bone architecture in vivo in rats. ***American Journal of Physiology-Renal Physiology***, 2014, 306.5: F517-F524.
- Gugala, Zbigniew, et al. Acute and severe trabecular bone loss in a rat model of critical illness myopathy. ***Journal of Orthopaedic Research®***, 2021.
- Hadjidakis, Dimitrios J. ANDROULAKIS, Ioannis I. Bone remodeling. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, 2006, 1092.1: 385-396.
- Halleen, Jussi M. et al. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. ***Clinical Laboratory***, 2006, 52.9-10: 499-510.
- Han, S. M. SZARZANOWICZ, T. E. ZIV, I. Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity, mineral density and strength in the rat femur. ***Clinical Biomechanics***, 1998, 13.7: 480-484.
- Hofbauer, L. C., et al. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. ***Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions***, 2004, 4.3: 268.
- Hu, Yin, et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord blood ameliorate bone loss in senile osteoporotic mice. ***Metabolism***, 2019, 95: 93-101.
- Huang, John C. et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. ***Journal of Bone and Mineral Research***, 2004, 19.2: 235-244.

- İnsal, Burcu; PIŞKIN, İlksin. Kemik Dokusunun Fizyolojisi. ***Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi***, 2017, 28.1: 28-32.
- Janckila, Anthony J. et al. Stable expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoforms by CHO cells. ***Clinica Chimica Acta***, 2002, 326.1-2: 113-122.
- Ji, Meng-Xia; YU, Qi. Primary osteoporosis in postmenopausal women. ***Chronic Diseases and Translational Medicine***, 2015, 1.01: 9-13.
- Zhang, J.; MENG, X.-W. Guidelines for Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention or Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. ***Chinese Journal of Clinical Pharmacology***, 2000, 16.1: 73-78.
- Kalu, Dike N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. ***Bone and Mineral***, 1991, 15.3: 175-191.
- Kapınas, Kristina; DELANY, Anne M. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. ***Arthritis Research & Therapy***, 2011, 13.3: 1-11.
- Kargın, F. UR, Fidancı. Kemik Metabolizmasının İzlenmesinde Biyokimyasal Belirteçler ve Klinik Önemi. ***Türk Veteriner Hekimliği Dergisi***, 2002, 14.1: 52-55.
- Khosla, Sundeep. Minireview: The opg/rankl/rank system. ***Endocrinology***, 2001, 142.12: 5050-5055.
- Kraut, Jeffrey A., et al. The effects of metabolic acidosis on bone formation and bone resorption in the rat. ***Kidney International***, 1986, 30.5: 694-700.
- Krieger, Nancy S. et al. Regulation of COX-2 mediates acid-induced bone calcium efflux in vitro. ***Journal of Bone and Mineral Research***, 2007, 22.6: 907-917.
- Lauritzen, D. B. et al. Effects of combined prostaglandin and alendronate treatment on the histomorphometry and biomechanical properties of bone in ovariectomized rats. ***Journal of Bone and Mineral Research***, 1993, 8.7: 871-879.
- Lerner, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. ***Journal of Dental Research***, 2006, 85.7: 584-595.
- LI, Xin, et al. Metabolomics-driven of relationships among kidney, bone marrow and bone of rats with postmenopausal osteoporosis. ***Bone***, 2022, 156: 116306.
- Orkoula, Malvina G. VARDAKI, Martha Z. KONTOYANNIS, Christos G. Study of bone matrix changes induced by osteoporosis in rat tibia using Raman spectroscopy. ***Vibrational Spectroscopy***, 2012, 63: 404-408.
- Paschalis, E. P. et al. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. ***Journal of Bone and Mineral Research***, 2001, 16.10: 1821-1828.
- Pathak, Janak L., et al. Systemic inflammation affects human osteocyte-specific protein and cytokine expression. ***Calcified Tissue International***, 2016, 98.6: 596-608.
- Pham, Amy Quynh Trang; XU, Li Hao Richie; MOE, Orson W. Drug-induced metabolic acidosis. ***F1000Research***, 2015, 4.
- Raisz, Lawrence G.; RODAN, Gideon A. Pathogenesis of osteoporosis. ***Endocrinology and Metabolism Clinics***, 2003, 32.1: 15-24.

Roodman, G. David. Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology*, 1999, 27.8: 1229-1241.

Rowe, p.; sharma, S. Physiology, Bone Remodeling.[Updated 2019 Mar 9]. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2020.

Rustom, Rana, et al. Oxidative stress in a novel model of chronic acidosis in LLC-PK1 cells. *Nephron Experimental Nephrology*, 2003, 95.1: e13-e23.

Salminen, Eeva, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of skeletal changes in prostate cancer. *Acta Oncologica*, 2005, 44.7: 742-747.

Seibel, Markus J. MEIER, Christian. Biochemical markers of bone turnover—Basic biochemistry and variability. In: Osteoporosis. **Humana Press**, 2010. p. 97-130.

Seibel, Markus J. Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. The Clinical biochemist. Reviews/**Australian Association of Clinical Biochemists**. 2005, 26.4: 97.

Singh, Sudhir; Kumar, Dharmendra; LAL, Atil Kumar. Serum osteocalcin as a diagnostic biomarker for primary osteoporosis in women. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 2015, 9.8: RC04.

South-paul, Jeanette E. Osteoporosis: part I. Evaluation and assessment. *American Family Physician*, 2001, 63.5: 897.

Štěpán, J. J., et al. Serum osteocalcin levels and bone alkaline phosphatase isoenzyme after oophorectomy and in primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1987, 64.5: 1079-1082.

Swaminathan, R. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta*, 2001, 313.1-2: 95-105.

Taichman, Russell S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 2005, 105.7: 2631-2639.

Tanaka, H., et al. Effect of IGF-I and PDGF administered in vivo on the expression of osteoblast-related genes in old rats. *Journal of Endocrinology*, 2002, 174.1: 63-70.

Tobeiha, Mohammad, et al. RANKL/RANK/OPG pathway: a mechanism involved in exercise-induced bone remodeling. *BioMed Research International*, 2020, 2020.

Tobiome, Hitoshi, et al. Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997, 82.7: 2056-2061.

Tunçay, Özge Ekin. Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması. 2013.

Turner, A. Simon. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *Eur Cell Mater*, 2001, 1.66-81: 13.

Tümay, S. The Basic Elements of Bone. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2008, 12.

Unal, Mustafa; JUNG, Hyungjin; AKKUS, Ozan. Novel Raman spectroscopic biomarkers indicate that postyield damage denatures bone's collagen. **Journal of bone and mineral research**, 2016, 31.5: 1015-1025.

Unal, Mustafa, et al. Assessing matrix quality by Raman spectroscopy helps predict fracture toughness of human cortical bone. **Scientific Reports**, 2019, 9.1: 1-13.

Unal, Mustafa. Raman spectroscopic determination of bone matrix quantity and quality augments prediction of human cortical bone mechanical properties. **Journal of Biomechanics**, 2021, 119: 110342.

Van straalen, Jan P., et al. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. **Clinica Chimica Acta**, 1991, 201.1-2: 27-33.

Vasikaran, Samuel, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. **Osteoporosis International**, 2011, 22.2: 391-420.

Wesson, Donald E. BUYASSE, Jerry M. BUSHINSKY, David A. Mechanisms of metabolic acidosis-induced kidney injury in chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, 2020, 31.3: 469-482.

Whittamore, Jonathan M. HATCH, Marguerite. Chronic metabolic acidosis reduces urinary oxalate excretion and promotes intestinal oxalate secretion in the rat. **Urolithiasis**, 2015, 43.6: 489-499.

Wu, Yuchin; ADEEB, Samer; DOSCHAK, Michael Roman. Using micro-CT derived bone microarchitecture to analyze bone stiffness-a case study on osteoporosis rat bone. **Frontiers in Endocrinology**, 2015, 6: 80.

Yousefzadeh, Nasibeh, et al. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. **EXCLI Journal**, 2020, 19: 89.

## 9. EKLER

## Ek 1- Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 01/10/2020-E.59574



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı :60758568-020/59574  
Konu :Başvurunuz Hk.

01/10/2020

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR

İlgi :28.08.2020 tarihli dilekçeniz  
10.150.1.89  
49

"Sıçanlarda Kronik Metabolik Sendrom Modelinin Kemik Doku Üzerine Etkisi "(13.08.2020-04 tar.top.) (PAUHADYEK - 2020/21) konulu çalışmanızda kullanılacak olan Wistar Albino sıçan cinsinin Sprague Dawley sıçan ile değiştirilmesi ile ilgili dilekçeniz görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasının Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 60 adet sıçan (Sprague Dawley) kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE  
Başkan