



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL  
OSTEOPOROZ MODELİNDE RESVERATROL'ÜN  
KEMİK DOKU ÜZERİNDEKİ BİYOMEKANİK VE  
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Şevval ÖZTÜRK

Haziran 2022  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL OSTEOPOROZ  
MODELİNDE RESVERATROL'ÜN KEMİK DOKU ÜZERİNDEKİ  
BİYOMEKANİK VE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN  
GÖSTERİLMESİ**

**ANATOMİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Şevval ÖZTÜRK**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ**

**Denizli, 2022**

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

Öğrenci Adı Soyadı : şevval ÖZTÜRK

İmza :

## ÖZET

### SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSSEL OSTEOPOROZ MODELİNDE RESVERATROL'ÜN KEMİK DOKU ÜZERİNDEKİ BİYOMEKANİK VE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Şevval ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tezi, Anatomi AD

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ

Haziran 2022, 56 Sayfa

Çalışmamızda 200-250 gr. ağırlıklarında, 12 haftalık Wistar albino cinsi toplam 60 dişi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları, her grupta 12 hayvan olacak şekilde Kontrol, Sham, Ovariectomi (OVX), OVX+Resveratrol-40 mg/kg/gün (OVX+Res40), OVX+Resveratrol-80 mg/kg/gün (OVX+Res80) olmak üzere randomize 5 farklı gruba ayrılmıştır. OVX, OVX+Res40, OVX+Res80 gruplarında ovariectomi yapılarak overler alınıp postmenopozal osteoporoz modeli oluşturulmuştur. Resveratrol, OVX+RES40 grubuna 40 mg/kg/gün, OVX+RES80 grubuna 80 mg/kg/gün olacak şekilde 10 hafta boyunca gavaj yoluyla tedavi amaçlı verilmiştir. Sham grubunda sadece batin açılıp kapatılarak yalancı cerrahi uygulanırken kontrol grubuna herhangi bir cerrahi işlem yapılmamıştır. 10 haftalık tedavi sürecinin sonunda tüm denekler sakrifiye edilmiş. Her bir denekten kan örnekleri, tibia ve femur örnekleri alınmıştır.

Kan örneklerinden serum alkalın fosfataz, serum osteokalsin, serum oksidan ve antioksidan seviyeleri ölçülmüştür. Kemik doku örneklerinde, biyomekanik testler, mikro-BT görüntülemeleri ve Raman spektroskopisi analizleri yapılmıştır. Ayrıca kemik örneklerinden PCR yöntemi ile ALP, OCN, RANKL, Runx2, OPG, SOST, PHEX, MEPE gen ekspresyon seviyelerindeki değişim gösterildi.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında resveratrol tedavisi verilen OVX+Res40, OVX+Res80 gruplarının eğme dayanımı OVX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksektir. Benzer şekilde mikro-BT sonuçlarına göre OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının BV/TV, total volüme, trabeküler volüme değerleri OVX grubuna ait bu değerlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek görülürken, trabeküler kalınlık değerinde ise OVX+Res80 ile OVX grupları arasında anlamlı bir fark görülmüştür. Raman spektroskopisi analizinde OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının  $v_1PO_4$  / Amit I,  $v_1PO_4$  / Amit I, Kristallinite ve  $v_1PO_4$  / Proline değerlerinin OVX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak özellikle 80 mg/kg/gün dozunda verilen resveratrolün osteoporozun kemik dokuda oluşturduğu harabiyeti engellediği görülmüştür. Tedavi amaçlı verilen resveratrol kemiğin mekanik özelliklerini kuvvetlendirirken osteoporozun kemiğin mikromimarisinde oluşturduğu tahribatı engellemiştir. Öte yandan kemik dokunun fizikokimyasal özelliklerinde de anlamlı iyileşmeler meydana getirmiştir. Resveratrolün tedavi edici bu etkilerinin diğer moleküler mekanizmalarla birlikte araştırılması elde edilen bu sonuçların geliştirilmesi açısından önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Osteoporoz, Resveratrol, Kemik, Ovariectomi, Raman Spektroskopisi

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**

**tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021SABE007).**

## ABSTRACT

### DEMONSTRATION OF BIOMECHANICAL AND MOLECULAR EFFECTS OF RESVERATROL ON BONE TISSUE IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS MODEL CREATED IN RATS

ÖZTÜRK, Şevval  
M.Sc., Thesis in Anatomy  
Supervisor: Assoc. Prof. Barış Özgür DÖNMEZ

June 2022, 56 Pages

60 female Wistar albino rats, 12 weeks old, weighing 200-250 g, were used in our study. Animals were randomly divided into 5 different groups with 12 animals in each group; Control, Sham, OVX, OVX+Resveratrol-40 mg/kg/day (OVX+Res40), OVX+Resveratrol-80 mg/kg/day (OVX+Res80). In OVX, OVX+Res40, OVX+Res80 groups, ovariectomy was performed and postmenopausal osteoporosis model was created. Resveratrol was administered to OVX+RES40 group at 40 mg/kg/day and to OVX+RES80 group at 80 mg/kg/day for treatment by oral gavage for 10 weeks. In Sham group, only the abdomen was opened and closed, while no surgical procedures were performed in Control group. At the end of 10 weeks treatment period, all subjects were sacrificed. Blood, tibia and femur samples were taken from each subject.

Serum alkaline phosphatase, serum osteocalcin, serum oxidant and antioxidant levels were measured from blood samples. Biomechanical tests, micro-CT imaging and Raman spectroscopy analyses were performed on bone tissue samples. In addition, changes in ALP, OCN, RANKL, Runx2, OPG, SOST, PHEX, MEPE gene expression levels were shown by PCR method in bone samples.

In the light of results obtained from our study, bending strength of OVX+Res40, OVX+Res80 groups treated with resveratrol is statistically significantly higher compared to OVX group. Similarly, micro-CT results showed that OVX+Res40 and OVX+Res80's values in BV/TV, total volume, trabecular volume were significantly higher from OVX group, while there were significant difference between OVX+Res80 and OVX groups in trabecular thickness values. Raman spectroscopy analysis revealed that v1PO4/Amide I, v1PO4/Amide I, Crystallinity and v1PO4 / Proline values of OVX+Res40 and OVX +Res80 groups were statistically significantly higher than OVX group.

As a result, it has been observed that resveratrol, especially given at a dose of 80 mg/kg/day, prevents destruction caused by osteoporosis in bone tissue. Resveratrol, given for therapeutic purposes, strengthens mechanical properties of bone, while preventing destruction caused by osteoporosis in the microarchitecture of bone. On the other hand, it has also brought significant improvements in physicochemical properties of bone tissue. It is important to investigate these therapeutic effects of resveratrol together with other molecular mechanisms in order to develop these results.

**Keywords** : Osteoporosis, Resveratrol, Bone tissue, Ovariectomy, Raman Spectroscopy

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project number 2021SABE007.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini sabırla paylaşan, her koşulda fikir ve çalışmalarımın desteğini esirgemeyen, bana rehber olan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ'e

Lisansüstü eğitimim boyunca tüm katkılarından dolayı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL, Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR, Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER ve Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR'a

Raman spektroskopisi analizleri sırasında yardımını hiç esirgemeyen Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa ÜNAL'a,

Biyomekanik testlerin yapılması için araştırma ve alt yapı laboratuvarlarını kullanmamı sağlayan İzmir Eğitim Sağlık Sanayi ve Yatırım AŞ ve Doç. Dr. Mehmet SARIKANAT'a,

Mikro-BT görüntülemeleri esnasında her türlü desteği sağlayan Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Mert OCAK'a,

Araştırma laboratuvarlarını kullanımına açan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Tıp Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY'a,

Rt-PCR deneylerinin yapılmasında ve analizinde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ'a,

Biyokimyasal parametrelerin analizlerinde yardımcı olan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT DÖNMEZ'e,

Tez dönemimin başından sonuna kadar her aşamasında desteğini aldığım Uzm. Dr. İbrahim CÜNEYİT başta olmak üzere Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Ve hayatım boyunca her konuda koşulsuz yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiren sevgili aileme teşekkür ederim.

Haziran-2022

Şevval ÖZTÜRK

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGELEr VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Amaç.....	<b>2</b>
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kemik Doku Anatomisi.....	<b>3</b>
2.2. Kemik Dokunun Hücresel Organizasyonu.....	<b>4</b>
2.3. Kemik Dokunun Biyomekanik Özellikleri ve Kemik Kırılganlığı.....	<b>5</b>
2.4. Osteoporoz Patofizyolojisi.....	<b>6</b>
2.5. Deneysel Osteoporoz Modeli ve Overektomi.....	<b>7</b>
2.6. Resveratrol ve Kemik Doku İlişkisi.....	<b>7</b>
2.7. Hipotez.....	<b>9</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>10</b>
3.1. Etik Kurul Onayı.....	<b>10</b>
3.2. Araştırmanın Tipi.....	<b>10</b>
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	<b>10</b>
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Overektomi Yapılması.....	<b>10</b>
3.5. Resveratrol Uygulaması ve Deneklerin Sakrifiye Edilmesi.....	<b>13</b>
3.6. Serum Alkalın Fosfataz ve Serum Osteokalsin Seviyelerinin Tayini.....	<b>13</b>
3.7. Serum Antioksidan ve Oksidan Seviyelerinin Tayini.....	<b>14</b>
3.8. Raman Spektroskopisi Deneyi.....	<b>16</b>
3.8.1. Raman Spektroskopisi Veri Analizinin Yapılması.....	<b>16</b>
3.9. Üç Nokta Eğme Testi (Three-Point Bending Test).....	<b>18</b>
3.9.1 Femurun Kesit Alanının Hesaplanması.....	<b>19</b>

3.9.2 Üç Nokta Eğme Testi Verilerinin Hesaplanması.....	20
3.10. Mikro-BT Görüntülemeleri.....	21
3.11. RT-PCR Deneyleri.....	21
3.11.1. Homojenizasyon ve Total RNA İzolasyonu.....	22
3.11.2. cDNA Sentezi ve RT-PCR.....	25
3.12. İstatistiksel Analiz.....	27
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>28</b>
4.1. Serum Alkalın Fosfataz ve Serum Osteokalsin Seviye Bulguları.....	28
4.2. Serum Total Antioksidan (TAS) ve Oksidan (TOS) Seviye Bulguları.....	30
4.3. Raman Spektroskopisi Bulguları.....	31
4.3.1. $\nu_1\text{PO}_4$ / Amit 1 Değeri.....	33
4.3.2. $\nu_1\text{PO}_4$ / Amit 3 Değeri.....	33
4.3.3. $\nu_1\text{PO}_4$ / Prolin Değeri.....	33
4.3.4. 1245 / 1270 $\text{cm}^{-1}$ Değeri.....	34
4.3.5. 1670 / 1640 $\text{cm}^{-1}$ Değeri.....	34
4.3.6. 1670 / 1690 $\text{cm}^{-1}$ Değeri.....	34
4.3.7. 1/FWHM Değeri (Kristallinite Analizi).....	35
4.3.8. GAG / Amit 3 Değeri.....	35
4.4. Üç Nokta Eğme Testi Bulguları.....	35
4.5. Mikro-BT Bulguları.....	36
4.5.1. BV / TV Değeri.....	36
4.5.2. Total Volüm Değeri.....	37
4.5.3. Trabeküler Volüm Değeri.....	37
4.5.4. Trabeküler Ortalama Kalınlık Değeri.....	39
4.5.5. Trabeküller Arası Mesafe.....	39
4.6. PCR Bulguları.....	39
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>41</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>52</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>53</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>57</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>58</b>

EK 1- Etik Kurul Kararı



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1</b> Resveratrolün kemik doku üzerindeki moleküler hedeflerinin tanımlanan mekanizması.....	9
<b>Şekil 2</b> Sıçanda bilateral overektomi işlemi. ....	11
<b>Şekil 3</b> Raman Spektroskopisi deneyi için kullanılan konfokal spektroskopi cihazı.....	16
<b>Şekil 4</b> Ortalamaları alınan Raman ham verilerinin LabSpec yazılımında gösterilmesi.....	17
<b>Şekil 5</b> LabSpec yazılımında verilerdeki arka plan gürültü yansımalarının uzaklaştırılması ve pürüzsüzleştirme işleminden sonra piklerin görünümü.....	17
<b>Şekil 6</b> Sıçan femur corpusu'nun transvers kesit alanının ImageJ yazılımı ile ölçümü.....	20
<b>Şekil 7</b> Serum ALP ve serum OCN seviyelerinin çubuk grafiği.....	29
<b>Şekil 8</b> Serum Total Antioksidan (TAS) ve Serum Total Oksidan (TOS) seviyelerinin çubuk grafiği.....	31
<b>Şekil 9</b> Raman spektra değerlerinin çubuk grafiği.....	32
<b>Şekil 10</b> Üç Nokta Eğme (Three-point bending) Testinden elde edilen eğme dayanımı (flexural strength) değerlerinin çubuk grafiği.....	36
<b>Şekil 11</b> Mikro-BT parametrelerinin çubuk grafiği.....	38
<b>Şekil 12</b> Primerlerin gen ekspresyon seviyesinin ısı haritalandırılmasıyla gösterimi.....	40

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1</b> Deney Grupları ve Gruplara Uygulanan İşlemler .....	12
<b>Tablo 2</b> Serum Alkalın Fosfataz ve Serum Osteokalsin Tayini İçin Deney Protokolü.....	14
<b>Tablo 3</b> Serum Total Antioksidan Seviyesinin Tayini İçin Deney Protokolü...15	15
<b>Tablo 4</b> Serum Total Oksidan Seviyesinin Tayini İçin Deney Protokolü.....15	15
<b>Tablo 5.</b> Raman Spektrum Bant Oranları.....	18
<b>Tablo 6</b> Kemik Doku Homojenizasyon Aşamaları.....	23
<b>Tablo 7</b> Total RNA İzolasyonu İçin Deney Protokolü.....	24
<b>Tablo 8</b> cDNA Sentez Karışımı.....	25
<b>Tablo 9</b> cDNA Sentez Karışımlarının Bekletildiği Sıcaklıklar ve Süreleri.....	25
<b>Tablo 10</b> Primer Baz Dizilimleri.....	26
<b>Tablo 11</b> RT-PCR Bileşimi.....	26
<b>Tablo 12</b> Deney gruplarının Serum TAS-TOS, Serum ALP-OCN, Üç Nokta Eğme Testi ve Mikro-BT görüntülemelerinden elde edilen değerler (ortalama± standart sapma).....	30

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Δ Abs.....	Absorbans Değişimi
μA.....	Mikroamper
μM.....	Mikromolar
μl.....	Mikrolitre
Al.....	Alüminyum
ALP.....	Alkalin Fosfataz
OCN.....	Kemik Gama-Karboksiglutamat Protein
BMD.....	Kemik Mineral Yoğunluğu
BSP.....	Kemik Sialoprotein
BT.....	Bilgisayarlı Tomografi
BV/TV.....	Kemik Hacminin İncelenen Bölgedeki Toplam Hacme Oranı
c-Fmsr.....	Koloni Stimulan Faktör Reseptörü
Ca.....	Kalsiyum
Cas no.....	Chemical Abstracts Service Number (Kimyasal Ürünler Servisi numarası)
CAT No.....	Katalog numarası
cDNA.....	Tamamlayıcı DNA
CH2-wag.....	Metilen bandı
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> .....	Prolin bandı
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> .....	Hidroksiprolin bandı
cm.....	Santimetre
col-1.....	Kollajen Tip 1
Col1A1.....	Kollajen tip 1 A1 geni
DEXA.....	Dual-energy X-ray Absorptiometri
DNase.....	Deoksiribonukleaz
FWHM.....	Full Width at Half Maximum (Maksimum Yarısı Tam Genişlik)
F <sub>max</sub> .....	Kemiğin Kırılma Anındaki Kuvvet Değeri
GAG.....	Glikozaminoglikan
GAPDH.....	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
gr.....	Gram
HRP.....	Yabanturpu Peroksidaz
Kg.....	Kilogram

kVp.....	Kilovolt Piki
L.....	Litre
L.....	İki Mesnet Arasındaki Mesafe
M-CSF.....	Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
MEPE.....	Matriks Ekstraselluler Fosfoligoprotein
mg.....	Miligram
mm <sup>2</sup> .....	Milimetre Kare
M <sub>max</sub> .....	Maksimum Eğme Momenti
Mmol.....	Milimol
ms.....	Milisaniye
mRNA.....	Messenger RNA
NAD <sup>+</sup> .....	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NF-kB.....	Nükleer Faktör kappa B
ng.....	Nanogram
nm.....	Nanometre
OCN.....	Osteokalsin
OPG.....	Osteoprotegerin
OSX.....	Osteriks
OVX.....	Overektomi
OVX+Res40.....	OVX+Resveratrol- 40 mg/kg/gün
OVX+Res80.....	OVX+Resveratrol-80 mg/kg/gün
p300.....	Histon Asetil Transferaz
PBS.....	Fosfat tamponlu Salin Solüsyonu
PHEX.....	Fosfat Düzenleyici Endopeptidaz Homologu X'e bağlı
PMOP.....	Postmenopozal Osteoporoz
PTH.....	Parathormon
PO <sub>4</sub> .....	Fosfat
RANK.....	Nükleer Faktör kappa B Reseptör Aktivatörü
RANKL.....	Nükleer kappa B Ligandın Reseptör Aktivatörü
RT-PCR.....	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAW 264.7.....	Lösemili Erkek Fareden Elde Edilmiş Makrofaj Hücre Hattı
RNA.....	Ribonükleik Asit
RNase.....	Ribonükleaz
Rpm.....	Dakikadaki Devir Sayısı

Runx2.....	Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü-2
Sirt-1.....	Sirtuin 1
SMI.....	Yapı Modeli Endeksi
SOST.....	Sklerostin
TAS.....	Total Antioksidan Seviyesi
Tb.N.....	Uzunluk Başına Düşen Ortalama Trabekül Sayısı
Tb.Sp.....	Trabeküller Arasındaki Ortalama Mesafe
Tb.Th.....	Trabeküllerin Ortalama Kalınlığı
TOS.....	Total Oksidan Seviyesi
$v_1CO_3$ .....	Karbonat Bandı
$v_1PO_4$ .....	Fosfat Bandı
Wnt- $\beta$ katenin...	Wingless-ilişkili entegrasyon bölgesi Beta Katenin

## 1.GİRİŞ

Osteoporoz tüm dünyada yaygın olarak görülen, iskelet sistemini ilgilendiren önemli bir sağlık problemidir. Özellikle postmenopozal dönemde görülen osteoporoz kemik dokunun mineral yapısını bozarak kemiklerde zayıflama ve kırıklara yol açar (Khosla and Hofbauer 2017). Bu dönemde oluşan kırıklar iş gücü kaybı ve tedavi masraflarıyla ülke ekonomilerine önemli oranda yük getirmektedir (Williams, Daigle vd. 2021). Postmenopozal osteoporozun kemik dokuda yarattığı bu tahribat, özellikle kemik dokunun mekanik yapısına zarar verir (Morgan, Unnikrisnan vd. 2018). Kemik dokuda oluşan bu hasarın tedavisi için pek çok tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Resveratrol nonflavonoid polifenolik bir bileşik olup üzüm, fındık ve böğürtlen gibi çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunur (Jiang, Luo vd. 2020). Resveratrol, osteoporotik mezenkimal hücrelerde proliferasyonu güçlendirir, östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen görevi görebilir. Resveratrol aynı zamanda Endoplazmik Retikulum-bağımlı ekstrasellüler-sinyal-regüle kinaz  $\frac{1}{2}$  aktivasyon yolu ile osteoblastik diferansiasyonu geliştirir, bunun sonucunda osteogenezi stimüle eder (Dai, Li vd. 2007). Bunun yanında resveratrolün diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda kan glikoz düzeyini düşürdüğü, obezitede adipogenezis'i inhibe ettiği gösterilmiştir (Baile, Yang vd. 2011, Szkudelska, Deniziak vd. 2019). Literatürde bulunan bu veriler ışığında, osteoporoz tedavisinde resveratrolün kemik doku üzerinde olumlu etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

## 1.1.Amaç

Çalışmada overektomi uygulanmış sıçanlarda farklı dozlarda (40 mg/kg ve 80 mg/kg) uygulanan resveratrolün osteoporozun kemik dokuda oluşturacağı tahribatın önüne geçip geçemeyeceği, kemik doku mikromimarisi, biyomekaniği ve fiziko-kimyasal özelliklerinin ortaya koyularak, resveratrolün koruyucu etkisinin bütüncül bir bakış açısıyla gösterilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Kemik Doku Anatomisi

Kemik, kendini sürekli yenileyebilen aynı zamanda yapım ve yıkım döngüsü içerisinde olan dinamik bir organdır. İnsanda postürün oluşmasına katkısının yanı sıra kemik iç organları koruma, medulla rubra ossis sayesinde hematopoez fonksiyonu bulunan, vücutta mineral homeostazisinde rol oynayan bir organdır.

Kemik genel olarak beyaz ve fildişi rengindedir fakat buna rağmen içinde kan dolaşımını sağlayan damarlar bulundurur. Kemik doku vücudu ve organları koruma görevi olmasından dolayı oldukça sert ve dayanıklı bir yapıdır fakat bununla birlikte aynı zamanda elastiktir. Kemiğin bu özelliklere sahip olmasını sağlayan ise organik maddeler ve inorganik tuzlardır (Arıncı K 1995). Kemik kalsiyum (Ca) ve fosfattan (PO<sub>4</sub>) oluşan inorganik içeriğe ve bu inorganik bileşimle iç içe geçmiş organik matrikse sahiptir. Kemiğin bu iki farklı bölümünün birbiriyle temas halinde ve koordine bir şekilde işlev görüyor olması, kemiği diğer bağ doku çeşitlerinden farklı kılar ve kemiğe benzersiz özellikler kazandırır. Kemiğin inorganik komponenti, kemiğe sertlik kazandırırken, organik matriks ise elastikiyet özelliği kazandırır (Nordin 2001). İnsan kemiğinin kuru ağırlığının %60-70'ini mineral yani inorganik bölüm oluştururken yaklaşık %30-40'ını organik komponentler oluşturur (Nordin 2001). Organik komponentleri ağırlıklı olarak tip-1 kollajen oluşturmakla beraber, geri kalan kısmı nonkollajenöz proteinler, ağırlıklı olarak glikozaminoglikanlar (GAG) oluşturur (Faibish, Ott vd. 2006, Gamsjaeger, Klaushofer vd. 2014). Nonkollajenöz proteinler, kollajen fibrilleri arasındaki gömülü mineral kristallerinin aralarındaki boşluğu doldurur (Surowiec, Allen vd. 2022).

Bir uzun kemiğin içyapısını incelemek için transvers bir kesit alındığında birbirinden farklı yapılara sahip iki bölüm görülür. Kemiğin dışındaki sert bölüme substantia compacta, iç kısımdaki daha yumuşak süngerimsi bölüme ise substantia spongiosa adı verilir. Özellikle substantia spongiosa bölümünde kemiğe uygulanan



mekanik yüklenmelerin dağılımını sağlayan kemik lameller bu görev için özelleşmiş yapılardır. Substantia spongiosa içerisinde yerleşmiş olan trabeküller dallanmış şekilde bulunurlar ve günlük hayatta kemiğe uygulanan basınç, kuvvet yüklenmesi ve burkulma gibi durumlarda kemiğin dayanıklı hale gelmesini sağlarlar. Kemiğin daha iç kısmında cavitas medullaris ossis adı verilen bir kanal bulunur ki bunun içinde de medulla rubra ossis adı verilen kemik iliği bulunur. İlerleyen yaşlarda kemik iliğinde yağ dokusu miktarı artar, sarı renge dönüşür ve medulla flava ossis adını alır (Gökmen 2003).

## 2.2. Kemik Dokunun Hücresel Organizasyonu

Kemik histolojik ve fonksiyonel olarak osteoklast, osteoblast ve osteosit hücreleri olmak üzere üç temel hücre grubundan oluşur. Osteoblastlar, mezenkimal kök hücre kaynaklı, kemik dokunun yapımında görev alan hücrelerdir. Osteoblastlar sahip olduğu golgi cisimciği ve geniş endoplazmik retikulum sayesinde kemik matriksine yeni osteoid salgılayan, küboidal hücre gruplarıdır (Florenco-Silva, Sasso vd. 2015). Mezenkimal kök hücrelerin olgun osteoblastlara farklılaşmasında pek çok spesifik gen ekspresyonu rol oynar. Osteoblastik diferansiyasyon, mezenkimal kök hücrelerin embriyonik gelişim, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında önemli rolü olan Wnt- $\beta$  katenin (Wingless-ilişkili entegrasyon bölgesi) sinyal yollarının aktifleşmesi ve kemik morfogenetik proteinlerinin sentezi vasıtasıyla öncül osteoblastik hücrelere farklılaşması ile başlar (Hu, Hilton vd. 2005). Öncül osteoblastik hücreler, bu farklılaşmada önemli rol oynayan Runx2 (Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü-2) ve Col1A1 (Kollajen tip 1 A1 geni) ekspresyonu ile proliferolurlar. Bu aşamada Runx2, Col1A1, ALP (Alkalin fosfataz), OCN (osteokalsin) gibi önemli kemik matriks proteinlerinin ekspresyonu osteoblastik farklılaşma için oldukça önemlidir (Narayanan, Srinaath vd. 2019). Osteositler ise kemik matriksine gömülmüş mezenkimal kök hücre kaynaklı osteoblastlardan farklılaşan hücrelerdir (Capulli, Paone vd. 2014). Osteositik farklılaşma, olgun osteoblastların hücre gövdelerinin küçülmesi, sitoplazmik uzantılarının oluşmasıyla karakterizedir. Osteoblastlar, kendi ürettikleri osteoid matriks içine gömülerek osteositlere farklılaşırlar. Osteoid matriksin mineralize olmaya başlamasıyla osteositlerin organel sayısında azalma oluşur ve bu da kollajen sentezinde azalma ile sonuçlanır. Osteositler, kendilerine özgü dentrit yapısından dolayı hücreler arası bağlantı sağlayan ve sinyal moleküllerinin geçişine imkân tanıyan multifonksiyonel hücrelerdir (Capulli, Paone vd. 2014). Hücreler arası iletişim fonksiyonunun yanı sıra osteositler, mekanosensitivite fonksiyonu sayesinde kemikte OPG (Osteoprotegerin) ve RANKL (Nükleer kappa B

Ligandın reseptör aktivatörü) ekspresyonu kaynaklı osteoblast-osteoklast aktivasyonlarını düzenler (Ansari, de Wildt vd. 2021). Matriks mineralizasyonu tamamlandıktan sonra Col1A1, OCN, ALP gibi osteoblast kaynaklı proteinlerin ekspresyonu inhibe olurken, kemik regülatör proteinlerinden olan olgun osteosit kaynaklı SOST (sklerostin) ekspresyonunun artması osteoblastik diferansiasyonun negatif regülasyonunu sağlar. Osteoklastlar, monosit/makrofaj kökenli, çoklu çekirdeğe sahip, kemik rezorbsiyonundan sorumlu hücrelerdir (Capulli, Paone vd. 2014). Osteoklastik diferansiasyonda iki temel mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan ilki, osteoblast hücreleri tarafından üretilen M-CSF (Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör)'ün preosteoklastlardan eksprese edilen c-Fmsr (Koloni Stimulan Faktör Reseptörüne) bağlanarak osteoklastik diferansiasyonu sağlamasıdır. Diğer mekanizma ise, osteoblastlardan üretilen RANKL sitokininin preosteoklastlardan eksprese edilen RANK (Nüklear Faktör kappa B reseptör aktivatörü) reseptörüne bağlanması ile gerçekleşir. RANKL sitokininin RANK hücre adezyon molekülüne bağlanması preosteoklastların olgun osteoklastlara diferansiye olmasını sağlar (Ansari, de Wildt vd. 2021). Osteoklastogenezis ile osteogenezis arasındaki dengenin sağlanması ise, osteoblastlar tarafından eksprese edilen OPG'nin RANKL sitokinlerine bağlanarak, RANKL-RANK etkileşimini engelleme mekanizmasından kaynaklanır (Capulli, Paone vd. 2014).

### **2.3. Kemik Dokunun Biyomekanik Özellikleri ve Kemik Kırılmalığı**

Biyomekanik kelimesi yaşam anlamına gelen “biyo” ve “mekanik” kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Biyomekanik kavramı ise kemik doku için kullanıldığında günlük hayatta kemik dokuya uygulanan farklı yön ve büyüklükteki kuvvetlerin kemik doku üzerinde yarattığı dönüşümlü ya da dönüşümsüz etkileri ifade eder (İbrahim Deniz AKÇALI 2009). Öte yandan osteoporoz ve diyabet gibi kemik dokunun yapısal bütünlüğünü bozan hastalıklar da kemiğin temel biyomekanik özelliklerini değiştirir. Oluşan bu olumsuz etkiler sonucunda kemik dokunun yapısal bütünlüğü bozulur, kemik zayıflar ve bunlar da kemiklerde kırıklara yol açar (Morgan, Unnikrisnan vd. 2018).

Kemiğin kırılmalı bir yapıya sahip olması genel olarak kemiğin kırıklara yatkınlığı olarak tanımlanır. Bununla birlikte kemiğin kırılması farklı nedenlerden dolayı olabilir. Kemiğin birincil görevi günlük hayatta maruz kaldığı yüklere karşı dayanıklı olmasıdır. Kemiğin maruz kaldığı bu yükler dayanma sınırını aşınca kırıklar meydana gelir. Bunun dışında kemiğin yapısal olarak zayıfladığı durumlarda dayanma sınırının altında

kuvvetler bile kemiklerde kırıklara yol açabilir. Osteoporoz gibi kemikleri etkileyen hastalıklar kırılabilir kemikleri meydana getirirler ve kemiklerin kırık riski artmış olur. Bu tarz hastalıkların sonucunda genel olarak kemikte farklı biyomekanik karakterler ortaya çıkar. Osteoporotik kemikler yüke maruz kaldıklarında daha az enerji soğururlar ve travma karşısında daha kolay kırılırlar (Turner 2002, Turner 2006).

Osteoporoz tedavisinde temel soru doku düzeyinde iyileşme nasıl sağlanır ya da kemik kırılabilirliği nasıl azaltılır olmalıdır. Osteoporotik bir kemiği güçlendirmenin temel olarak üç yolu vardır. Bunlardan ilki kemik kütlesinin artırılmasıdır. Çünkü kemik kütlesinin fazla olduğu kemikler daha fazla yük taşıyabilirler. İkinci yol kemik kütlesinin kemik üzerinde eşit olarak dağıtılmasıdır. Anatomik olarak kemiklerin farklı geometrik şekillerde olduğunu düşünürsek kemik kütlesinin ve yoğunluğunun kemik dokunun her bölgesinde eşit olarak dağıtılması kemik kırılabilirliğini dolayısıyla kırık riskini azaltacaktır. Üçüncü yol ise kemik dokunun yapısal özelliklerinin normal değerler içerisinde tutulmasıdır. Kemik dokunun organik ve inorganik bölümlerinin normal değerler içerisinde kalması kemik dokuyu kırılmalara karşı koruyacaktır (Turner and Burr 1993, Turner 2002).

#### **2.4. Osteoporoz Patofizyolojisi**

Osteoporoz düşük kemik yoğunluğu ile karakterize önemli bir sistemik iskelet hastalığıdır. Kemik mineral yoğunluğunun azalması nedeni ile kemikte yapısal zayıflamalar meydana gelir bu durum da kırık riskinin artmasına yol açar (Brown 2021). Oluşan bu tablonun kliniğe yansımaları kırılabilirliğe bağlı kırıkların gözlemlenmesidir ve klinikte görülen kırıkların yaklaşık %80 i osteoporozla bağlıdır (Bessette, Ste-Marie vd. 2008). Osteoporozla bağlı olarak gelişen bu kırıklar yaşam kalitesinin düşmesi, iş gücü kaybı ve tedavi masraflarıyla ülke ekonomilerine önemli bir yük getirmektedir (Brown, Adachi vd. 2021). Ülke ekonomileri, sağlık sistemleri ve yaşam kalitesini etkileyen osteoporoz son yıllarda önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Postmenopozal osteoporoz, postmenopozal dönemde östrojen eksikliğinden dolayı meydana gelir. Meydana gelen östrojen eksikliği kemik kitlesinde hızlı bir azalmaya yol açar. Kemikte osteoblastik aktivite azalır ve bu sürecin sonucunda osteoporoz meydana gelir (Glaser and Kaplan 1997). Osteoporozda osteoklastların sayısı ortalama olarak 2 ile 3 katlı bir artış gösterir (Parfitt, Mathews vd. 1983). Bu artış kemiğin yeniden yapılanma aktivitesindeki artış ile ilişkili olsa da postmenopozun erken dönemindeki kemiğin

resorbsiyonunda da artış görülmektedir. Tüm bu süreçler özellikle trabeküler yapılara zarar vererek kemiğin zayıflamasına yol açar (Kanis 1997).

Osteoporoz primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Postmenopozal osteoporoz (tip 1) ve senil osteoporoz (tip 2), primer osteoporoz çeşitleridir (Dobbs, Buckwalter vd. 1999). Postmenopozal osteoporoz Genelde tüm kemiklerde görülmekle birlikte özellikle corpus vertebrae ve caput femoris'te daha belirgindir ve bu bölgelerde kırıklar daha çok görülür (Glaser and Kaplan 1997). Sekonder osteoporoz ise sistemik hastalıklar, böbrek ve karaciğer hastalıkları gibi etiyolojik mekanizmalarla açıklanan osteoporoz türüdür.

## **2.5. Deneysel Osteoporoz Modeli ve Overektomi**

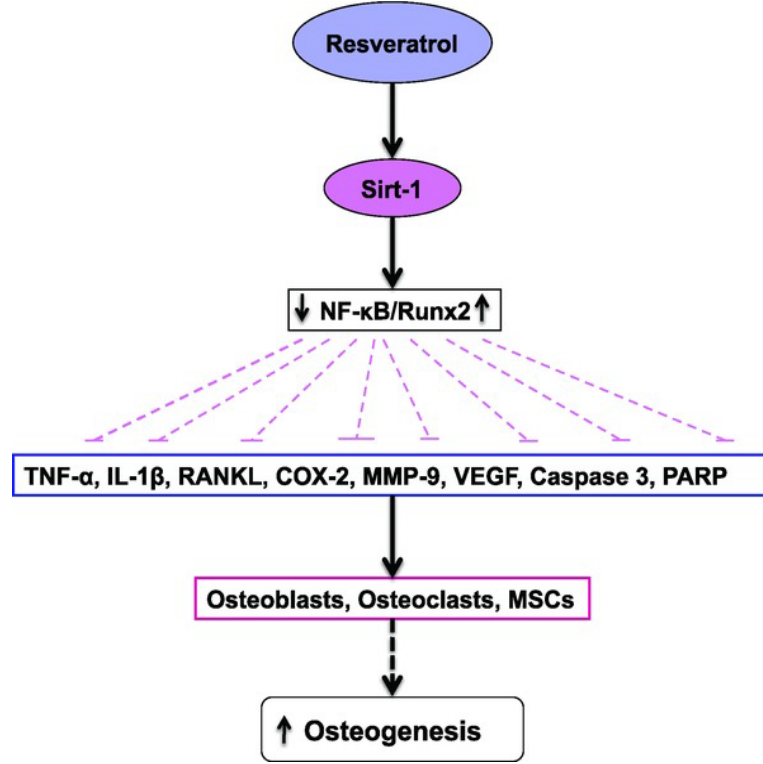
Kadınlarda fizyolojik olarak östron, östradiol ve östriol olmak üzere üç çeşit östrojen bulunmaktadır. Postmenopozal dönemde başlıca ovaryumlardan sentezlenen östradiol seviyesinde azalma görülmektedir (Cui, Shen vd. 2013). Overektomi ovaryumların cerrahi işleme alınmasıdır. Bu işlem östrodiol salgılanamayacağından dolayı deneysel olarak postmenopozal dönemi taklit etmek için uzun yıllardan beri kullanılan bir yöntemdir. Overektomi yapıldıktan sekiz hafta sonra kademeli olarak kemik yapımı azalır (Erben, Bromm vd. 1998). Overektomiden hemen sonra deney hayvanında kemik yapım ve yıkımında meydana gelen değişiklikler postmenopozal dönemde gözlemlenen değişikliklerle büyük benzerlik gösterir (Bagi, Mecham vd. 1993, Busse, Hahn vd. 2009). Özellikle overektomiden 10 hafta sonra kemik dokuda osteoporozun tüm etkileri görülür. Overektomiden 12 hafta sonra sıçan femurlarının biyomekanik özelliklerinin ve kemik mineral yoğunluğunun sağlıklı sıçan femurlarına göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gösterilmiştir (Donmez, Ozdemir vd. 2012).

## **2.6. Resveratrol ve Kemik Doku İlişkisi**

Resveratrol (trans 3,5,4'trihydroxystilbene), nonflavonoid polifenolik bir bileşik olup; üzüm, fındık ve böğürtlen gibi çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunur (Jiang, Luo vd. 2020). Resveratrolün antioksidan özelliği vardır ve selektif östrojen reseptör modülatörü

olarak adlandırılan 'fitoöstrojen' grubuna ait bir maddedir (de la Lastra and Villegas 2005, Tasci, Bilgili vd. 2010). Resveratrolün postmenopozal osteoporoz modeli oluşturulan sıçanlarda kemik kalitesini önemli ölçüde iyileştirdiği, osteoblastik diferansiasyonu uyardığı gösterilmiştir (Yang, Jiang vd. 2019, Wang, Zhang vd. 2020). Resveratrol, alkalın fosfataz, Runx2, osteriks (OSX) gibi kemik yapım markerlarının ekspresyonunu arttırarak, osteojenik diferansiasyonu uyarır (Anh, Eden vd. 2001). Alkalın fosfataz, osteoblastlar tarafından sentezlenen, osteoklastlar tarafından kan dolaşımına bırakılan kemik yapım biomarkerlarından biridir (Anh, Eden vd. 2001). Resveratrol tedavisinin osteoporoz sonrası ALP seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Jiang, Luo vd. 2020).

Resveratrol, Sirt-1 (Sirtuin 1) genini (NAD<sup>+</sup>-bağımlı histon deasetilaz) uyarır. Sirt1 geni, kemik doku resorpsiyonu ile kemik yapımı arasındaki dengeyi regüle eder. Resveratrol yokluğunda ise Sirt-1 geni, RANKL sitokini ile bağlantısı üzerinden kemik resorpsiyonunu regüle eder. RANKL, p300 (histon asetil transferaz) ekspresyonunu arttırarak NF-kB'nin (Nuclear Factor kappa B) asetilasyonunu teşvik eder ve aktivasyonunu uyarır. Resveratrol, RANKL kaynaklı asetilasyon inhibisyonu sağlayarak, NF-kB'nin nükleer translokasyonunu engellemiş olur (Şekil 1). Resveratrolün, fare osteoklast progenitörü RAW 264.7 hücrelerinin nükleer faktör kB ligand (RANKL) kaynaklı osteoklast farklılaşmasının reseptör aktivatörü üzerindeki önleyici etkisini reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibisyonu yoluyla yaptığı gösterilmiştir (He, Andersson vd. 2010). Sirt-1, alkalın fosfataz, osteokalsin ve osteopontin gibi kemik doku formasyonu ile ilgili önemli markerların gen ekspresyonundan sorumlu Runx2 ile birleşir. Runx2, OSC, OPN, col-1 (kollajen tip1), BSP (kemik sialoprotein), osterix gibi osteogenezden sorumlu proteinlerin aktivasyonunu indükler (Lasaite and Krasauskiene 2009, Wang, Zhang vd. 2020).



**Şekil 1.** Resveratrolün kemik doku üzerindeki moleküler hedeflerinin tanımlanan mekanizması, osteoporoz ve osteogenez üzerine etkisi (Mobasheri and Shakibaei 2013).

## 2.7.Hipotez

Çalışmamızın hipotezleri şunlardır;

- 1- Postmenopozal osteoporoz, kemik mineral yoğunluğunu azaltır, kemiğin biyomekanik özelliklerini zayıflatır ve kemik kırık riskini arttırır.
- 2- Postmenopozal osteoporoz modelinde önleyici amaçla uygulanan resveratrol kemik yapımında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyesini arttırır,
- 3- Postmenopozal osteoporoz modelinde önleyici amaçla uygulanan resveratrol kemik dokunun fiziko-kimyasal, biyomekanik özelliklerini geliştirir ve kemik kırık riskini azaltır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Etik Kurul Onayı**

Çalışmamızın Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 13.08.2020 tarihindeki 2020/04 nolu toplantısında PAUHDEK 2020-22 no ile etik kurul onayı alınmıştır (Ek-1).

#### **3.2. Araştırmanın Tipi**

Araştırmanın tipi, prelinik randomize bir deneysel araştırmadır.

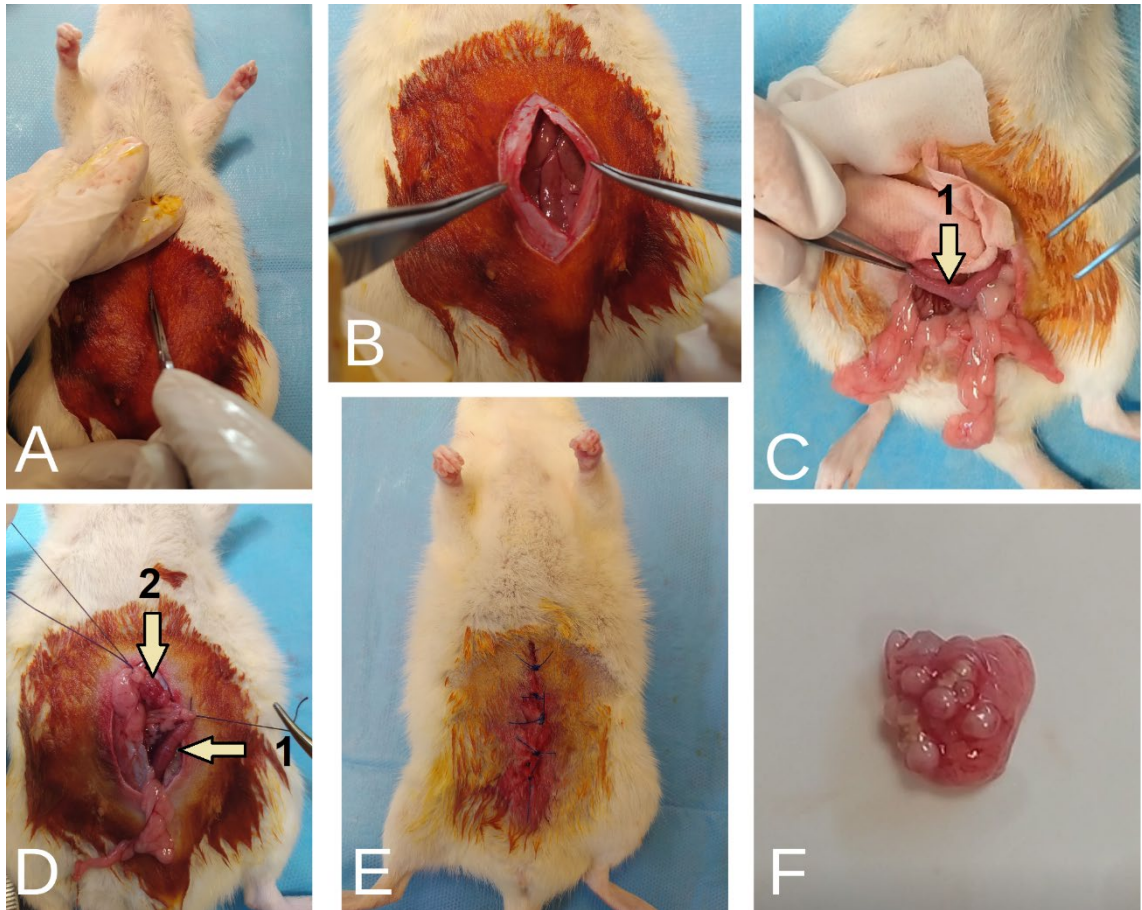
#### **3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi**

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 12 haftalık ağırlığı 200-250 gr. arasında değişen, Wistar albino cinsinde 60 dişi sıçan araştırmanın evrenini oluşturmaktadır.

#### **3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Overektomi Yapılması**

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ağırlığı 200-250 gr. arasında değişen, üreme hikayesi olmayan, 12 haftalık Wistar albino cinsi 60 dişi sıçan çalışmaya dahil edildi. Tüm deney grupları 12 saat

gündüz, 12 saat gece döngüsünde ad libitum olarak beslendi. Deney hayvanları, her grupta 12 hayvan olacak şekilde Kontrol, Sham, Overektomi (OVX), OVX+Resveratrol-40 mg/kg/gün (OVX+Res40), OVX+Resveratrol-80 mg/kg/gün (OVX+Res80) olmak üzere randomize beş farklı gruba ayrıldı. OVX, OVX+Res40, OVX+Res80 gruplarına, intramusküler 60 mg/kg ketamin + 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında bilateral overektomi uygulandı (Şekil 2). Sham grubuna sadece batin açılıp kapatılarak yalancı cerrahi uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı. Deneklere overektomi işlemi sonrası analjezik verildi ve batin bölgesine yedi gün boyunca her gün polivinilpirolidon iyodür (Cas No: 25655-41-8 %10) ile pansuman yapıldı. Denekler yedi gün boyunca her kafeste tek sıçan olacak şekilde ayrıldı. Gruplara yapılan işlemler Tablo 1'de verilmiştir.



**Şekil 2.** Sıçanda bilateral overektomi işlemi. A. Opere edilecek bölge tıraş edilip, polivinilpirolidon iyodür ile sterilize edilerek ameliyata hazırlandı. B. Orta hat insizyonu ile cilt ve cilt altı katlar geçilerek cavitas abdominalis'e girildi. C. Overlere ulaşmak amacıyla uterus bulundu. '1' numaralı ok uterusu göstermektedir. D. Overler, proksimalde mezoovaryumdan, distalde cornu uteri'den emilebilir cerrahi suture ile bağlanarak eksize edildi. '1' numaralı ok uterusu, '2' numaralı ok overi göstermektedir. E. Bilateral overektomi sonrası batin katları sırasıyla suture edilerek kapatıldı. F. Eksize edilen over gösterilmektedir.



**Tablo 1.** Deney Grupları ve Gruplara Uygulanan İşlemler.

<b>Gruplar (n=12)</b>	<b>Yapılan Cerrahi İşlem</b>	<b>Uygulanan Etken Madde</b>	<b>Etken Madde Uygulama Yolu</b>	<b>Maddenin Uygulanma Süresi (hafta)</b>
Kontrol	İşlem yapılmadı.	%7'lik ethanol solüsyonu	Oral gavaj	10
Sham	Sadece batin açılıp, suture ile kapatıldı.	%7'lik ethanol solüsyonu	Oral gavaj	10
OVX	Overektomi	%7'lik ethanol solüsyonu	Oral gavaj	10
OVX+Res40	Overektomi	%7'lik ethanol solüsyonunda çözünmüş 40 mg/kg resveratrol	Oral gavaj	10
OVX+Res80	Overektomi	%7'lik ethanol solüsyonunda çözünmüş 80 mg/kg resveratrol	Oral gavaj	10

### 3.5. Resveratrol Uygulamasý ve Deneklerin Sakrifiye Edilmesi

Denekler, operasyondan yedi gün sonra her kafeste 4 sýçan olacak Őekilde yerleŐtirildi. Tüm denekler standart yem ve su ile ad libitum olarak beslendi. Overektomi iŐleminden yedi gün sonra 10 hafta boyunca Kontrol, Sham ve Overektomi grubuna %7'lik ethanol solüsyonu/gün, OVX+Res40 grubuna 40 mg/kg/gün, OVX+Res80 grubuna 80 mg/kg/gün %99 saflýkta toz halde resveratrol (LiftMode, Chicago, Amerika BirleŐik Devletleri) %7'lik ethanol solüsyonunda çözdürülerek oral gavaj yolu ile verildi. Her iki haftada bir deneklerin vücut ađrýlýđý ölçüldü. On hafta sonunda denekler yüksek doz anestezik madde altında sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen deneklerin aorta abdominalis'inden 5 ml kan alındý. Alınan kan rneleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar eppendorflara aktarýlarak -80°C'de muhafaza edildi. Sakrifiye edilen deneklerin her iki arka ekstremitesinin tibia ve femur kemikleri eksize edildi. Elde edilen kemik dokular, etraf kas ve ligamentlerden ayrýldý, serum fizyolojik çözeltisi ile yýkanýp, dehidratasyonu engellemek amacıyla PBS solüsyonuna batýrýlup -20 °C'de saklandı.

-80°C'de muhafaza edilen serum rnelerinden serum alkaline fosfatase ve serum osteokalsin, serum TAS ve TOS tayini yapıldý. -20 °C'de muhafaza edilen sađ femur rneleri önce Raman spektroskopisi analizlerinde, sonra üç nokta eđme testinde kullanıldı. Sol femur rneleri mikro-BT görüntülemelerinde, sađ tibia rneleri ise Rt-PCR deneylerinde kullanıldı.

### 3.6. Serum Alkaline Fosfatase ve Serum Osteokalsin Seviyelerinin Tayini

Pamukkale Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalý Laboratuvarý'nda gerçekteŐtirilen serum alkaline fosfatase (CAT No: EK720604) ve serum osteokalsin (CAT No: EK720811) tayininde AFG Bioscience™ Elisa kitleri (sandviç enzim bađlı immünosorbent yöntemi) kullanıldı. Her gruptan sekiz serum rneđi deneye dahil edildi. Serum alkaline fosfatase ve serum osteokalsin seviyelerinin tayini için -80 °C'den oda sıcaklýđına getirilen rneler ilgili Elisa kitlerin protokolüne tabii tutuldu (Tablo 2).

---

**Tablo 2.** Serum Alkalin Fosfataz ve Serum Osteokalsin Tayini İçin Deney Protokolü.

No	Yapılan İşlem
1	20 ml konsantre yıkama tamponu, distile su ile 600 ml olacak şekilde dilüe edildi. Her tüpe 50 µl standart dilüent eklenerek, dilüsyon protokolüne uygun standartlar hazırlandı.
2.	Sıçan ALP ve OCN antikoları ile kaplanmış kuyucuklara 50 µl standart eklendi. Serum örneklerinin konulacağı kuyucuklara önce 40 µl örnek dilüent, sonra 10 µl serum örneği eklenerek örneklerin dilüsyonu sağlandı.
3	Plakalar, 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
4	Plakalara, yıkama tamponu ile 5 defa yıkama işlemi uygulandı.
5	Her kuyucuğa immün kompleks oluşturmak amacıyla 50 µl horseradish peroksidaz (HRP) enzimi eklendi (Boş kuyucuk hariç).
6	3 no'lu işlem tekrarlandı.
7	4 no'lu işlem tekrarlandı.
8	Her kuyucuğa 50 µl Kromojen Solüsyonu A ve 50 µl Kromojen solüsyonu B eklenerek mavi rengin açığa çıkması için karanlıkta 37°C'de 15 dakika inkübasyon yapıldı.
9	Her kuyucuğa reaksiyonu durdurmak amacıyla 50 µl durdurma solüsyonu eklendi, plakalardaki mavi rengin sarı renge dönüştüğü gözlemlendi.
10	Kuyucuklardaki absorbans değerleri, 450 nm'de kolorimetrik olarak ölçüldü.

### 3.7. Serum Antioksidan ve Oksidan Seviyelerinin Tayini

Pamukkale Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen serum total antioksidan seviyesi (TAS) (Tablo 3) ve total oksidan seviyesi (TOS) (Tablo 4) tayininde Rel Assay Diagnostics™ Elisa kitleri kullanıldı. Her gruptan 12 serum örneği deneye dahil edildi. -80 °C'den oda sıcaklığına getirilen serum örnekler ilgili Elisa kitlerin protokolüne tabii tutuldu.

**Tablo 3.** Serum Total Antioksidan Seviyesinin Tayini İçin Deney Protokolü.

No	Yapılan İşlem
1	10'ar µl blank, TAS standardı ve serum örneği plaka düzenine göre kuyucuklara konuldu.
2	Her kuyucuğa 165 µl reagent 1 eklendi ve plaka dikkatlice çalkalandı.
3	2 no'lu işlemden 30 saniye sonra plaka 660 nm dalga boyunda okutularak "absorbans 1" değeri elde edildi.
4	Her kuyucuğa 25 µl reagent 2 eklendi ve plaka dikkatlice çalkalandı.
5	Plaka 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.
6	Plaka 660 nm dalga boyunda okutularak "absorbans 2" değeri elde edildi.
7	Standart, serum örneği ve H <sub>2</sub> O için Absorbans değişimi ( $\Delta$ Abs): $\Delta$ Abs= Absorbans 2-Absorbans 1 eşitliğinden hesaplandı.
8	Sonuçlar ( $\Delta$ Abs H <sub>2</sub> O- $\Delta$ Abs Örnek) / ( $\Delta$ Abs H <sub>2</sub> O- $\Delta$ Abs Standart) formülü ile mmol Trolox Equivalent / L olarak hesaplandı.

**Tablo 4.** Serum Total Oksidan Seviyesinin Tayini İçin Deney Protokolü.

No	Yapılan İşlem
1	30'ar µl blank, TOS standardı ve serum örneği plaka düzenine göre kuyucuklara konuldu.
2	Her kuyucuğa 200 µl reagent 1 eklendi ve plaka dikkatlice çalkalandı.
3	2 no'lu işlemden 30 saniye sonra plaka 530 nm dalga boyunda okutularak "absorbans 1" değeri elde edildi.
4	Her kuyucuğa 10 µl reagent 2 eklendi ve plaka dikkatlice çalkalandı.
5	Plaka 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.
6	Plaka 530 nm dalga boyunda okutularak "absorbans 2" değeri elde edildi.
7	Standart ve serum örneği absorbans değişimi ( $\Delta$ Abs): $\Delta$ Abs= Absorbans 2-Absorbans 1 eşitliğinden hesaplandı.
8	Sonuçlar ( $\Delta$ Abs Örnek) / ( $\Delta$ Abs Standart) $\times 10^*$ formülü ile µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equivalent / L olarak hesaplandı. (*=standardın konsantrasyonu)

### 3.8. Raman Spektroskopisi Deneyi

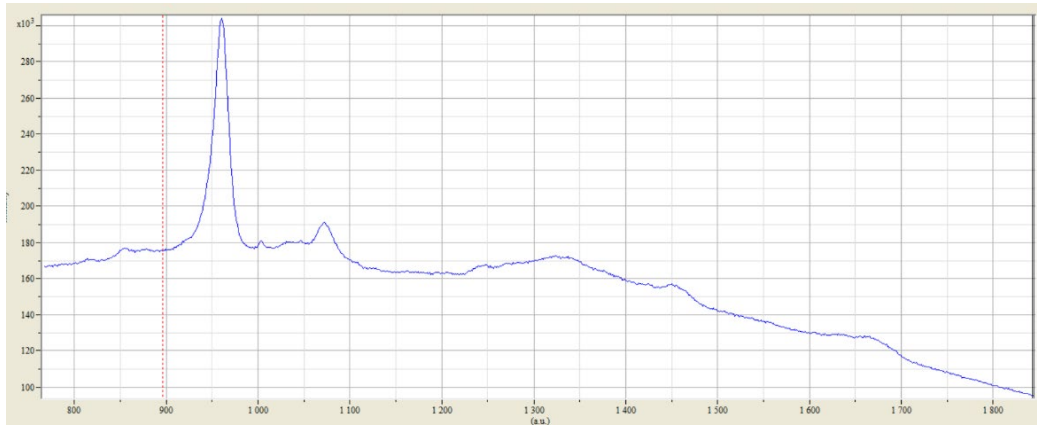
Raman Spektroskopisi deneyleri, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Bütçe yetersizliği nedeniyle her deney grubundan 10'ar farklı sağ femur örneği olacak şekilde toplam 50 kemik deneye dahil edildi. Kemik doku örnekleri, Raman Spektroskopisi deneyine başlanmadan önce PBS solüsyonu ile yıkanıp, cerrahi sünger ile kurulandı. Her örneğe, Renishaw inVia™ konfokal Raman mikroskobu (Wotton-under-Edge, Birleşik Krallık) kullanılarak, 785 nm'de 1335 spektra orta noktasında, 20x objektifinde, 5 saniye x 10 ortalama lazer atımı yapıldı (Şekil 3).



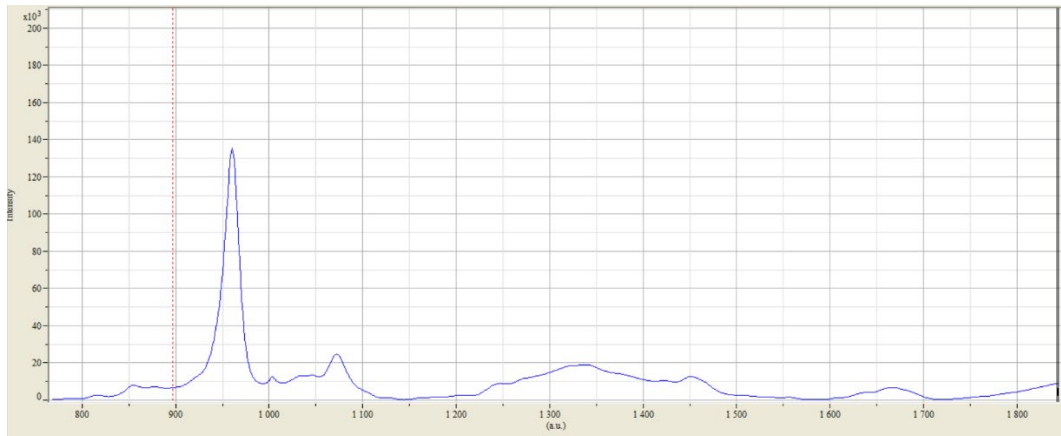
**Şekil 3.** Raman Spektroskopisi deneyi için kullanılan konfokal spektroskopi cihazı (Renishaw inVia™ confocal Raman Microscope, Wotton-under-Edge, Birleşik Krallık).

#### 3.8.1. Raman Spektroskopisi Veri Analizinin Yapılması

Lazer ışını atışları, tüm örnek kemik gövdelerinin 2 farklı noktasına yapılarak, her kemik örneğinden iki farklı ham veri elde edildi. Elde edilen ham veriler, Microsoft Excel (Redmond, Washington, Amerika Birleşik Devletleri) formuna aktarıldı. 800-1800  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki Raman kayma aralığına karşılık gelen Raman ışın piklerinin ortalamaları alındı. Ortalamaları hesaplanan ham verilere, arka plan gürültü yansımalarının elimine edilmesi amacıyla LabSpec yazılımı (Kyoto, Japonya) kullanıldı (Şekil 4). LabSpec yazılımında 5. derece polinom seçilerek, piklerin zemin çizgisi düzenlenmesi (baseline correction) ve gürültü yansımaları uzaklaştırma işlemi yapıldı. Arka plan yansımalarından uzaklaştırılan veriler, yine LabSpec yazılımına aktarıldı (Şekil 5).



**Şekil 4.** Ortalamaları alınan Raman ham verilerinin LabSpec yazılımında gösterilmesi.



**Şekil 5.** LabSpec yazılımında verilerdeki arka plan gürültü yansımalarının uzaklaştırılması ve pürüzsüzleştirme işleminden sonra piklerin görünümü.

Aktarılan verilerden, kemik dokunun inorganik ve organik bileşenlerini temsil eden Raman bantlarına karşılık gelen ışık yoğunlukları (Raman Intensity) belirlendi. Kemik dokunun mineral içeriğini gösteren fosfat ( $\nu_1\text{PO}_4$ ,  $960\text{ cm}^{-1}$ ), karbonat ( $\nu_1\text{CO}_3$ ,  $1070\text{ cm}^{-1}$ ), organik matris özelliklerini yansıtan prolin ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$ ,  $855\text{ cm}^{-1}$  ya da  $920\text{ cm}^{-1}$ ), hidroksiprolin ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$ ,  $876\text{ cm}^{-1}$ ), amit 1 ( $1600\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ), amit 3 ( $1243\text{-}1320\text{ cm}^{-1}$ ), metilen ( $\text{CH}_2\text{-wag}$ ,  $1450\text{ cm}^{-1}$ ) spektral aralıklarının pik noktaları belirlenip, bu pik noktalarına karşılık gelen ışık yoğunluk değerleri tespit edildi (Unal, Ahmed vd. 2021).

Kemik dokuda mineral/matriks oranını, kollajenin sarmal yapısını, kollajen fibrillerinin oryantasyonunu, kalitesini ve olgunluğunu, mineral yapısında değişiklik olup olmadığını ve mineral olgunluğunu gösterebilmek amacıyla Tablo 5 'te verilen Raman spektra bant oranları hesaplandı.

Kemikte kristal yapı analizi için ise  $1 / \text{FWHM}$  ( $\nu_1\text{PO}_4$  pikinin yarı ışık yoğunluğundaki bant genişliği) Origin Pro 8.5 yazılımı (Northampton, MA 01060, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak hesaplandı. Raman Spektroskopisi analizleri sonrasında kemik örnekleri, üç nokta eğme testi yapılana kadar  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

**Tablo 5.** Raman Spektrum Bant Oranları.

Özellik	Raman Bant Oranları
Mineral / Matriks oranı	$\nu_1\text{PO}_4 / \text{amit } 1$ , $\nu_1\text{PO}_4 / \text{amit } 3$ , $\nu_1\text{PO}_4 / \text{prolin}$ , $\nu_1\text{PO}_4 / \text{CH}_2$
Kollajen fibril oryantasyonu, sarmal yapısı, olgunluğu	hidroksiprolin / prolin, $1245 / 1270\text{ cm}^{-1}$ , $1670 / 1640\text{ cm}^{-1}$ , $1670 / 1690\text{ cm}^{-1}$
Karbonizasyon (Mineral yapı olgunluğu)	$\text{CO}_3 / \nu_1\text{PO}_4$
Kristal yapısı	$1 / \text{FWHM}$
Hidratasyon özelliği	GAG / amit 3

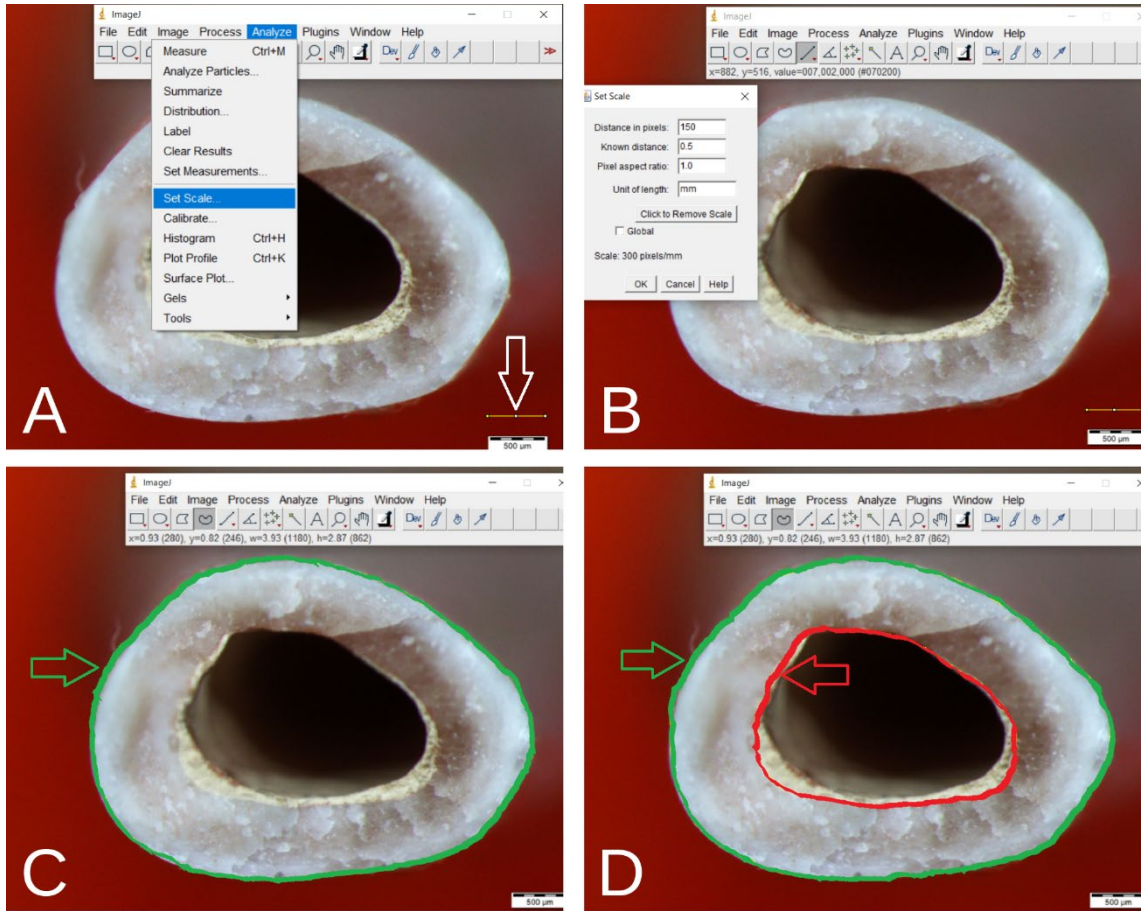
### 3.9. Üç Nokta Eğme Testi (Three Point Bending Test)

Üç nokta eğme testi İzmir Eğitim Sağlık Sanayi ve Yatırım A.Ş. araştırma laboratuvarlarında Universal Testing Machine Hegewald-Peschke (Am Gründchen 1, 01683 Nossen, Almanya) cihazıyla yapıldı. Tüm deney gruplarına ait eksiz edilmiş femurlar  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'den oda sıcaklığına getirildi. Femurlar, iki mesnet arası mesafe 15 mm olacak şekilde mesafenin orta noktasına yatay olarak yerleştirildi. Yükleme hızı 2 mm/dk olacak şekilde, kemiklerin orta noktasına superior-inferior yönde, kemikte kırılma oluşana kadar eğme kuvveti uygulandı. Elde edilen kırılma esnasında oluşan maksimum kuvvetler her bir örnek için kaydedildi.

### 3.9.1. Femurun Kesit Alanının Hesaplanması

Üç nokta eğme testi sonucunda kırılan femur kemik örneklerinin distal parçaları kesit alanı hesaplamaları için kullanıldı. Kemik doku örneklerinin kırılan yüzeyleri rotor kullanılarak pürüzsüzleştirilip görüntülemeye uygun hale getirildi. Kemiklerin transvers kırık alanlarının fotoğraflanması, Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Laboratuvarı'nda Olympus™ SZX7 stereo mikroskobu (Shinjuku, Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi. 1600×1200 çözünürlük, 2.5x büyütme kullanılarak distal femur gövdelerinden elde edilen fotoğraflar Image J™ yazılımına (Bethesda, Maryland, Amerika Birleşik Devletleri) aktarıldı. Image J yazılımı ile femurların toplam yüzey alanı, cavitas medullaris ossis yüzey alanı ve kortikal kemik yüzey alanı mm<sup>2</sup> cinsinden hesaplandı (Şekil 6).





**Şekil 6** Sıçan femur gövdesinin transvers kesit alanının ImageJ yazılımı ile ölçümü. A. Mikroskopik fotoğrafta 500 µm ile gösterilen alanın üzerine programdaki 'straight' menüsü kullanılarak referans bir cetvel çizildi. Referans cetvel, şekilde ok ile gösterilmektedir. B. Programda uzunluk kalibrasyonu için önce 'analyze' menüsü seçilip, sonra 'set scale' menüsünden 'known distance' değeri 0.5, 'unit of length' birimi mm olarak ayarlandı. C. 'Free hand selections' menüsü seçilerek manuel olarak şekilde yeşil okla gösterilen total kemik yüzeyi çizildi. Daha sonra 'analyze' menüsünden 'measure' seçilip total kemik yüzey alanı ölçüldü. D. C'deki işlemlerin aynısı şekilde kırmızı ok ile gösterilen cavitas medullaris ossis alan ölçümü için yapıldı ve total kemik yüzey alanından cavitas medullaris ossis alanı çıkartılarak kortikal kemik yüzey alanı hesaplandı.

### 3.9.2. Üç Nokta Eğme Testi Verilerinin Hesaplanması

Femur örneklerinde kırılma oluşana kadar uygulanan eğme kuvveti (F) artırılırken, bu kuvvete karşı kemikte oluşan çökme değeri ölçüldü. Örneklerde maksimum eğme kuvvetinde oluşan maksimum eğme momenti  $M_{maks} = F_{maks} \times L/4$  formülü kullanılarak hesaplandı. Formülde  $M_{maks}$  maksimum eğme momentini,  $F_{maks}$  kemiğin kırılma anındaki kuvvet değerini, L ise iki mesnet arasındaki mesafeyi temsil eder.

Örneklerin dairesel kesitlerinin atalet momentleri  $I$  ( $\text{mm}^4$ ), olmak üzere  $I = \pi (R_2^4 - R_1^4) / 4$  denkleminden hesaplandı. Atalet momentleri hesaplanan örneklerin uygulanan kuvvete karşı eğme dayanımı ( $\sigma$ ) ise  $\sigma_{\text{maks}} = M_{\text{maks}} C / I$  olarak hesaplandı.

### 3.10. Mikro-BT Görüntülemeleri

Her gruptan 12 tane toplam 60 sol femur örneğinin Mikro-BT görüntülemeleri Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde yapıldı. Örnekler, standart örnek tutucu içerisine yerleştirdi. Taramalar, Bruker Skyscan 1275 cihazı (Kontich, Belgium) kullanılarak yapıldı. Tarama parametreleri 80 kVp enerji, 125  $\mu\text{A}$  yoğunluk, 360 derece çekim, 10  $\mu\text{m}$  voxel size, 0.2 döndürme derecesi ve 49 ms maruziyet süresi olarak belirlendi. Filtre olarak 0.1 mm Al kullanıldı. Elde edilen ham veri görüntüleri (.tif formatında 1800 adet radyografi) NRecon rekonstrüksiyon yazılımı (SkyScan, Antwerp, Belçika) kullanılarak yeniden oluşturuldu ve bu aşamada tarama sırasında oluşan radyolojik artefaktları giderildi. Bu işlem sonrasında örneklerin aksiyel kesit görüntüleri (.bmp formatında) elde edildi. Görüntüler Dataviewer yazılımına (SkyScan, Antwerp, Belçika) yüklenerek örnekler çoklu eksenlerde (aksiyel, koronal, sagittal ve modifiye eksenlerde) görüntülendi. Örneklerin mikro kemik yapısının üç boyutlu analizleri için CTAn (SkyScan SkyScan, Antwerp, Belçika) yazılımı kullanıldı. Yapılan bu analizler sırasıyla BV/TV (% cinsinden kemik hacminin incelenen bölgedeki toplam hacme oranı), Tb.N ( $\text{mm}^{-1}$  cinsinden birim uzunluk başına düşen ortalama trabekül sayısı), Tb.Th (mm cinsinden doğrudan 3D ölçüm yöntemleri kullanılarak değerlendirilen trabeküllerin ortalama kalınlığı), Tb.Sp (mm cinsinden doğrudan 3D ölçüm kullanılarak değerlendirilen trabeküller arasındaki ortalama mesafe) ve SMI (Yapı modeli endeksi, trabekül yapısının bir göstergesi) değerleridir.

### 3.11. RT-PCR Deneyleri

Tüm gruplardan 1, 4, 7, 11 ve 12 numaralı toplam 25 tibia örneği gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) deneyleri için kullanıldı. Deneyler, Pamukkale Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Kemik dokular homojenize

edilip PureLink™ RNA Mini Kit (CAT No: 12183018A) kullanılarak total RNA elde edildi. Elde edilen RNA'lardan Applied Biosystems™ High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Cat No: 4387406) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. cDNA'lardan ALP, OCN, RANKL, Runx2, OPG, SOST, PHEX, MEPE gen ekspresyon seviyeleri PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (CAT No: A25918) yardımıyla RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişim, GAPDH housekeeping/referans genine göre normalize edilip analiz yapıldı. Elde edilen veriler GraphPad Prism 7 programında 'ısı haritalandırılması' yapılarak şematize edildi.

### **3.11.1. Homojenizasyon ve Total RNA İzolasyonu**

Tüm gruplardan 5'er farklı tibia örneği homojenize edilip, homojenize örneklerden PureLink RNA Mini Kit (CAT No: 12183018A) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Homojenizasyon ve RNA izolasyonu kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi (Tablo 6 ve 7).

**Tablo 6** Kemik Doku Homojenizasyon Aşamaları

---

No	Yapılan İşlem
1	-20 °C'den çıkartılan tibia örnekleri sıvı nitrojen kullanılarak homojenizasyona hazır hale getirildi.
2	Tibialar homojenizasyon için steril havan ve tokmak kullanılarak toz hale getirildi.
3	Toz hale getirilen doku örnekleri, 2 ml hacimli RNase/DNase içermeyen Cryo tüplere koyuldu. Doku örnekleri hassas terazide tartılarak her örnekten 50 mg olacak şekilde 1,5 ml hacimli RNase/DNase içermeyen mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi.
4	Yıkama Tamponu II solüsyonuna 60 ml %99,8 saflıkta etanol eklendi.
5	25 doku örneği için 5 örneklik olası hata payı göz önünde bulundurularak toplam 30 örneklik 30 ml Lysis Tamponu 50 ml hacimli steril RNase/DNase içermeyen santrifüj tüpünde hazırlandı.
6	30 ml Lysis Tamponu içine her 1 ml Lysis Tamponu için 10 µl 2-merkaptoetanol olacak şekilde toplam 300 µl 2-merkaptoetanol eklendi.
7	50 mg doku başına 1 ml Lysis Tamponu solüsyonu eklenip, rotor stator homojenizatör yardımıyla doku homojenizasyonu sağlandı. Homojenat, 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.

---

**Tablo 7** Total RNA İzolasyonu İçin Deney Protokolü

No	Yapılan İşlem
1	Her homojenata bir volüm %70 etanol eklenip, vorteks ile karıştırıldı.
2	500 µl homojenat spin cartridge içine transfer edildi (700 µl spin cartridge hacminden fazla olduğu için 500 µl homojenat tercih edildi.)
3	Homojenat, oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edilip spin cartridge altındaki toplama tüpünde oluşan süpernatant boşaltıldı.
4	2 ve 3 no'lu işlemler tekrarlandı.
5	500 µl Yıkama Tamponu I spin cartridge içine eklendi, oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edilip toplama tüpü ve toplama tüpünde oluşan süpernatant atıldı. Spin cartridge yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
6	500 µl Yıkama Tamponu II spin cartridge içine eklendi, oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edilip toplama tüpünde oluşan süpernatant boşaltıldı.
7	6 no'lu işlem tekrarlandı.
8	RNA'nın bağlandığı membranın kurutulması için spin cartridge 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edilip spin cartridge toplama tüpünden ayrılıp recovery tüpüne yerleştirildi.
9	60 µl RNase içermeyen su spin cartridge içine koyularak spin cartridge oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
10	Membrana bağlanmış RNA'yı recovery tüpüne elüe edilmesi için oda sıcaklığında 12.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
11	Elde edilen RNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.

İzole edilen RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop Spektroskopisi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) ile analiz edildi. Analiz için ND 1000 V3.6.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Nanodrop Spektroskopisi'ne 1 µl RNase içermeyen su koyularak ölçüm standardize edildi. Analiz sırasında buz üzerinde muhafaza edilen RNA örneklerinden 1'er µl olacak şekilde pipetlenip örnekler cihaza yerleştirildi. RNA örneklerinin saflığı kullanılan yazılımda 260 ve 280 nm'de, konsantrasyonları ng / µl cinsinden analiz edildi.

### 3.11.2. cDNA Sentezi ve RT-PCR

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi Applied Biosystems™ High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (CAT No: 4387406) kullanılarak kit protokolüne uygun yapıldı (Tablo 8).

**Tablo 8** cDNA Sentez Karışımı

Hacim	İçerik
10 µl	2X RT Tampon Karışımı
1 µl	20X RT Enzim Karışımı
Maksimum 9 µl	RNA örneği
Değişken	Nükleaz içermeyen su
20 µl	Total (reaksiyon başına)

cDNA sentez karışımı hazırlandıktan sonra karışım, Tablo 9'da belirtilen sıcaklıklarda bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, daha sonra RT-PCR aşaması için -20 °C'de muhafaza edildi.

**Tablo 9** cDNA Sentez Karışımlarının Bekletildiği Sıcaklıklar ve Süreleri

	Aşama 1	Aşama 2	Aşama 3
<b>Sıcaklık</b>	37 °C	95 °C	4 °C
<b>Süre</b>	60 dakika	5 dakika	∞

Elde edilen 20'şer µl'lik cDNA'lar nükleaz içermeyen su kullanılarak 180 µl olacak şekilde dilüe edildi. Kurutulmuş olarak teslim alınan primerlerin 100 µM derişimle stok haline getirilmesi için nükleaz içermeyen su kullanılarak pipetaj ile çözünmesi sağlandı. Stok haline getirilen primerlerden 10'ar µM ara stok 0,2 ml hacimli RNase/DNase içermeyen PCR tüplere aktarıldı. Kalan ana stok primerler -20 °C'de muhafaza edildi. RT-PCR reaksiyonlarında, PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) ve PikoReal Software 2.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak her bir döngü sonunda amplifikasyon ürünlerinin değişimi anlık olarak takip

edildi. RT-PCR reaksiyonlarında kullanılan primer baz dizilimleri (5'-3') Tablo 10' da, kuyucuk başına düşen reaksiyon bileşimi de Tablo 11'de gösterilmiştir.

**Tablo 10** Primer Baz Dizilimleri

Primer	Forward	Reverse
<b>GAPDH</b>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA
<b>ALPL</b>	TCCCAAAGGCTTCTTCTTGC	ATGGCCTCATCCATCTCCAC
<b>Runx2</b>	GGCGTCAAACAGCCTCTTCA	GCTCACGTCGCTCATCTTGC
<b>Col1a1</b>	CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT
<b>PHEX</b>	TACTGCCTGAAGCCAGAATG	CCACAGAAAGATTTACTTTGCTCA
<b>MEPE</b>	ACTGTTCCCTCTTCAGTATGAC	TGATATTTCTGAGGAGGGTG
<b>RANKL</b>	AGCGAAGACACAGAAGCACTAC	TTTATGGGAACCCGATGGGATG
<b>OCN</b>	GGGCAGTAAGGTGGTGAATAG	AGTCCTGGAGAGTAGCCAAAG
<b>Sost</b>	AGAGAACAACCAGACCATGAACC	GTCTCAGGTCCGAAGTCCTTG
<b>OPG</b>	CGAGTGATGAATGCGTGTACTG	CTTCGCACAGGGTGACATCTATT

**Tablo 11** RT-PCR Bileşimi

Hacim	İçerik
5 µl	PowerUp™ SYBR™ Green Master Karışımı (2X)
0,5 µl	Forward ve reverse primerler
1 µl	cDNA
3,5 µl	Nükleaz içermeyen su
10 µl	Toplam

### 3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizleri yapılan kantitatif parametreler:

- 1- Serum osteokalsin ve serum alkalın fosfataz seviyeleri
- 2- TAS (Total antioksidan seviyesi) ve TOS (Total oksidan seviyesi) ölçümleri
- 3- Biyomekanik testlerden elde edilecek sonuçlar: Maksimum dayanma kuvveti (Newton), eğme dayanımı (MPa)
- 4- Mikro-BT ölçümleri: BV/TV (kemik hacminin incelenen bölgedeki toplam hacmine oranı), Tb.Th (Doğrudan 3D ölçüm yöntemleri kullanılarak değerlendirilen trabeküllerin ortalama kalınlığı), Tb.Sp (Doğrudan 3D ölçüm kullanılarak değerlendirilen trabeküller arasındaki ortalama mesafe)
- 5- Raman spektroskopisi: Mineral matriks-organik matriks band oranı, Fosfat/Amide I band oranı, Fosfat/Amide III band oranları, Fosfat/CH<sub>2</sub> band oranları, Fosfat/Proline band oranları, Carbon/Fosfat band oranları, Crystallinity (kristalleşme parametresi) cm<sup>-1</sup>

Kalitatif, semikantitatif parametreler:

- 1- PCR: RT-PCR tekniği, kalitatif bir analizdir; ancak analiz sonrasında elde edilen ilgili mRNA ekspresyon bantlarının yoğunluğu Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile belirlenmiş ve kontrol olarak kullanılan GAPDH gen ekspresyonuna ait bantların yoğunluğu ile oranlanarak sonuçlar verilmiştir. Böylece sonuçta yarı-kantitatif olarak ilgili mRNA bantlarının yoğunlukları ifade edilmiştir.

Elde edilen kantitatif ve semikantitatif verilerin normal dağılıma uygunlukları test edildikten sonra normal dağılıma uyan verilerde ANOVA testi kullanılarak gruplar arası farkın anlamlılığı ortaya koyulmuştur. Normal dağılıma uymayan verilerde ise Kruskal Wallis testi yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu durumlarda farkı yaratan grubun saptanması için post-hoc analizi yapılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkinin ortaya konulması için Pearson korelasyon analizi yapılmıştır.

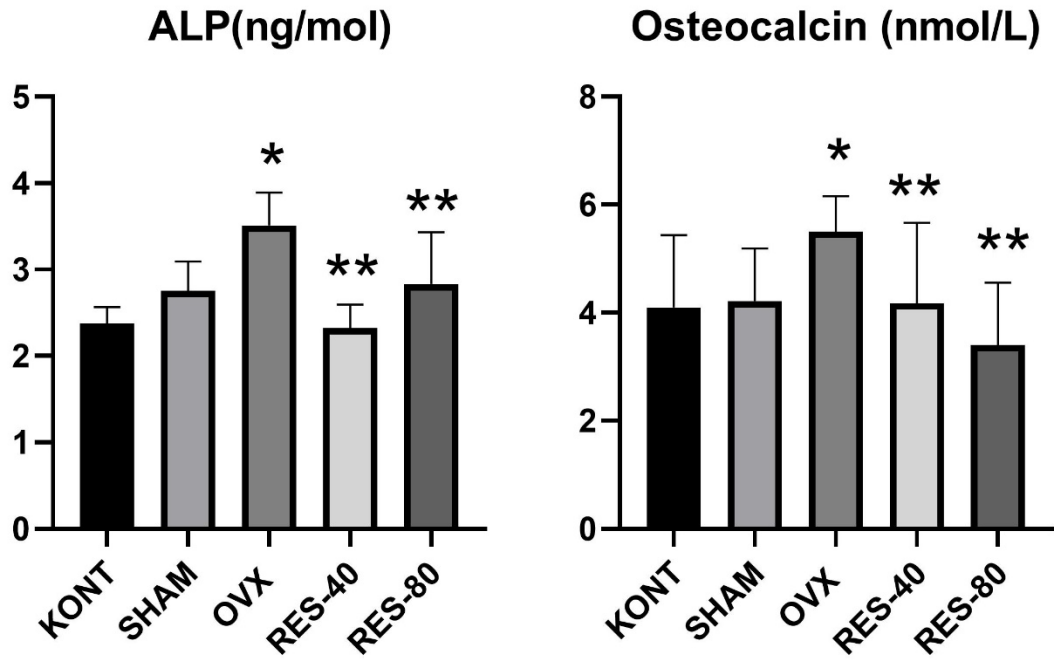


## 4.BULGULAR

### 4.1. Serum Alkalin Fosfataz ve Serum Osteokalsin Seviye Bulguları

Sıçanlardan alınan kan örneklerinde serum ALP ve OCN seviyelerine bakıldı (Tablo 12). Serum ALP seviyeleri, OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,0001$ ) (Şekil 7). Öte yandan resveratrol tedavisi verilen OVX+Res80 grubunun serum ALP seviyesi, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken ( $p=0,0317$ ) OVX+Res40 grubunun serum ALP seviyesi ise OVX grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,0001$ ). Yüksek doz resveratrol tedavisi verilen OVX+Res80 grubunun serum ALP seviyesinde, OVX grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir ( $p=0,0007$ ). Her iki doz resveratrol grubunun serum ALP seviyeleri anlamlı derecede birbirinden farklı bulundu ( $p=0,0081$ ).

Serum OCN seviyesinde ise en yüksek değer OVX grubunda tespit edilmiştir. OVX grubundaki bu artış kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ( $p=0,0048$ ). Resveratrol tedavisi verilen OVX+Res40 ( $p=0,0153$ ) ve OVX+Res80 ( $p<0,0001$ ) gruplarından ise OCN seviyesi OVX grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu ortaya koyulmuştur. Düşük ve yüksek doz resveratrol tedavisi verilen OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının OCN değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).



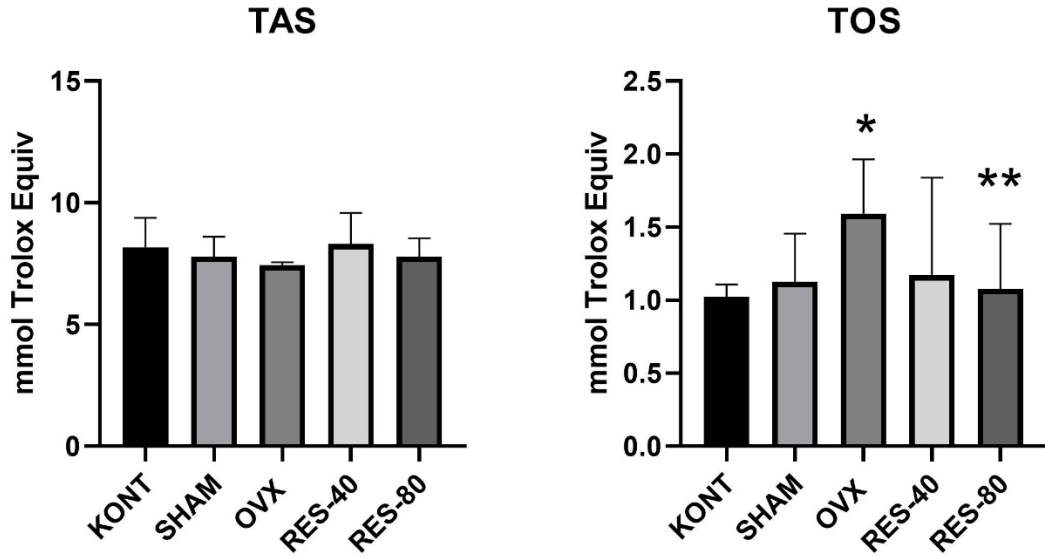
**Şekil 7** Serum ALP ve serum OCN seviyelerinin çubuk grafiği. Grafikteki değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma değerlerini göstermektedir. \*Kontrol grubuna göre anlamlı fark ( $p < 0,05$ ), \*\* OVX grubuna göre anlamlı fark ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 12.** Deney gruplarının Serum TAS-TOS, Serum ALP-OCN, Üç Nokta Eğme Testi ve Mikro-BT görüntülemelerinden elde edilen değerler (ortalama± standart sapma). \* p<0,05 kontrol grubuna karşı ve \*\* p<0,05 OVX grubuna karşı.

	Kontrol	SHAM	OVX	OVX+Res40	OVX+Res80
<b>Elisa Deneyleri</b>					
Serum ALP (ng/mol)	2,37±0,18	2,75±0,34	3,51±0,37 *	2,32±0,27 **	2,82±0,62 **
Serum OCN (nmol/L)	4,09±1,34	4,21±0,97	5,5±0,64 *	4,17±1,49 **	3,4±1,15 **
Serum TAS (mmol Trolox Equiv/ L)	8,15±1,22	7,79±0,82	7,42±0,13	8,3±1,27	7,77±0,75
Serum TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equivalent / L)	1,02±0,08	1,12±0,32	1,59±0,37 *	1,17±0,66	1,07±0,44 **
<b>Eğme Testi</b>					
Eğme Dayanımı (MPa)	13,54±1,38	12,15±1,55	10,15±0,87*	13,10±1,51**	13,11±0,89**
<b>Mikro-BT</b>					
BV/TV (%)	10,15±0,74	9,81±1,48	8,96±1,06*	9,24±1,13 *	9,62±1,04 **
Total Volüm	305,16±21,7	298,75±40,5	273,86±35,8*	303,62±30,1**	306,58±23,2**
Tb.Vol	30,14±2,39	28,86±2,77	26,71±2,3*	27,81±2,17*	29,97±1,78**
Tb.Th (mm)	0,93±0,02	0,92±0,03	0,90±0,02*	0,91±0,03	0,93±0,03**
Tb.Sp (mm)	3,75±0,28	3,91±0,3	4,07±0,26*	3,92±0,3	3,76±0,22**

#### 4.2. Serum Total Antioksidan (TAS) ve Oksidan (TOS) Seviye Bulguları

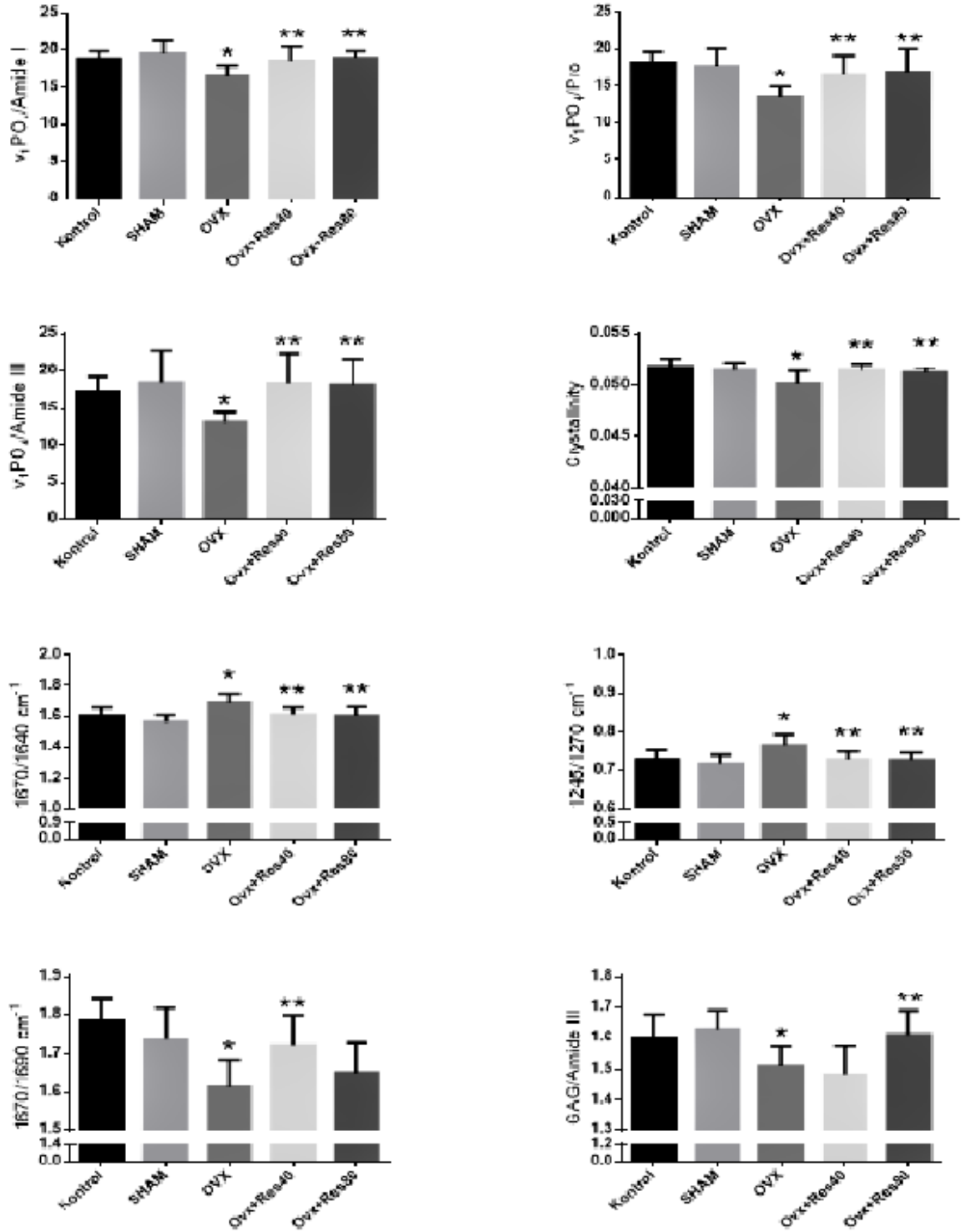
Çalışmamızdan elde edilen TAS ve TOS ölçüm sonuçları Tablo 12’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre Resveratrol verilen gruplarda dahil olmak üzere gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (p =0.1769) (Şekil 8). Total oksidan seviye bulgularında ise OVX grubunun TOS değerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir (p<0,05). Öte yandan 80 mg/kg/gün resveratrol tedavisi verilen OVX+RES 80 grubunun istatistiksel olarak anlamlı oranda OVX grubundan daha düşük olduğu (p<0,05) gözlemlenirken bu değer kontrol grubuyla aynı seviyeye geldiği belirlenmiştir.



**Şekil 8** Serum Total Antioksidan (TAS) ve Serum Total Oksidan (TOS) seviyelerinin çubuk grafiği. Grafikteki değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma değerlerini göstermektedir. \*Kontrol grubuna göre anlamlı fark ( $p < 0,05$ ), \*\* OVX grubuna göre anlamlı fark ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Raman Spektroskopisi Bulguları

Raman spektroskopisi analizlerinde her gruptan 10 farklı femur deneye dahil edildi. 5 saniye  $\times$  10 ortalama lazer atımı yapılan femurların spektrumlarının ortalamaları hesaplanarak tek bir spektruma dönüştürüldü. Arka plan gürültü yansımalarından uzaklaştırılan piklerde, femurun dokusal karakterini göstermek amacıyla  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 1,  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 3,  $\nu_1\text{PO}_4$  / prolin,  $\nu_1\text{PO}_4$  /  $\text{CH}_2$ , hidroksiprolin / prolin,  $1245 / 1270 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1670 / 1640 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1670 / 1690 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{CO}_3 / \nu_1\text{PO}_4$ , GAG / amit 3, 1 / FWHM değerleri hesaplandı (Şekil 9).



**Şekil 9** Raman spektroskopisi değerlerinin çubuk grafiği. Kontrol (n=10), SHAM (n=10), OVX (n=10), OVX+Res40 (n=10), OVX+Res80 (n=10). Grafikteki değerler aritmetik ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir. \*Kontrol grubuna göre anlamlı fark (p<0,05), \*\*OVX grubuna göre anlamlı fark (p<0,05).

#### 4.3.1. $v_1PO_4$ / Amit 1 Değeri

Mineral/Matriks oranını temsil eden parametrelerden  $v_1PO_4$  / amit 1 oranı değerleri OVX grubunda oluşan osteoporozla ilgili olarak kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktür ( $p=0.0033$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res40), Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). İki farklı dozda resveratrol tedavisi uygulanan OVX+Res40 ( $p=0.0109$ ) ve OVX+Res80 ( $p=0.0023$ ) gruplarının  $v_1PO_4$  / amit 1 değerinde OVX grubuna göre anlamlı artış bulundu (Bknz. Şekil 9).

#### 4.3.2. $v_1PO_4$ / Amit 3 Değeri

Mineral/Matriks oranını temsil eden parametrelerden  $v_1PO_4$  / amit 3 oranı değerleri OVX grubunda osteoporozla ilgili olarak kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0.0375$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res40), Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80), SHAM-(OVX+Res40), SHAM-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). İki farklı dozda resveratrol uygulanan OVX+Res40 ( $p=0.0069$ ) ve OVX+Res80 ( $p=0.0085$ ) gruplarının  $v_1PO_4$  / amit 3 değerinde OVX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (Bknz. Şekil 9).

#### 4.3.3. $v_1PO_4$ / Prolin Değeri

Mineral/Matriks oranını temsil eden parametrelerden  $v_1PO_4$  / prolin değeri ise yine benzer şekilde OVX grubunda osteoporozla ilgili olarak kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0.0003$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res40), Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80), SHAM-(OVX+Res40), SHAM-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunamazken ( $p>0,05$ ) iki farklı dozda resveratrol uygulanan OVX+Res40 ( $p=0.0276$ ) ve OVX+Res80 ( $p=0.0114$ ) gruplarının  $v_1PO_4$  / prolin değeri OVX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmıştır (Bknz. Şekil 9).

#### 4.3.4. 1245 / 1270 cm<sup>-1</sup> Değeri

Kollajen denatürasyonu ile ilişkili parametrelerden olan 1245 / 1270 cm<sup>-1</sup> değerinde OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış bulundu (p=0.0068). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res40), Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80), SHAM-(OVX+Res40), SHAM-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). Fakat İki farklı dozda resveratrol uygulanan OVX+Res40 (p=0.0068) ve OVX+Res80 (p=0.0047) gruplarının 1245 / 1270 cm<sup>-1</sup> değeri OVX grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktür (Bknz. Şekil 9).

#### 4.3.5. 1670 / 1640 cm<sup>-1</sup> Değeri

Kollajen denatürasyonu ile ilişkili parametrelerden olan 1670 / 1640 cm<sup>-1</sup> değerinde ise OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış görülürken (p=0.0006) kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res40), Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80), SHAM-(OVX+Res40), SHAM-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). İki farklı dozda resveratrol uygulanan OVX+Res40 (p=0.0023) ve OVX+Res80 (p=0.0006) gruplarının 1670 / 1640 cm<sup>-1</sup> değeri OVX grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu (Bknz. Şekil 9).

#### 4.3.6. 1670 / 1690 cm<sup>-1</sup> Değeri

Kollajenin yapısal olgunluk parametresi olan 1670 / 1690 cm<sup>-1</sup> değeri, OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktür (p<0.0001). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res40), Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80), SHAM-(OVX+Res40), SHAM-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). 40 mg/kg/gün dozunda uygulanan OVX+Res40 grubunun 1670 / 1690 cm<sup>-1</sup> değerinde OVX grubuna göre anlamlı artış bulunurken (p=0.0121) 80 mg/kg/gün dozunda uygulanan OVX+Res80 grubunun 1670 / 1690 cm<sup>-1</sup> değeri ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05) (Bknz. Şekil 9).

#### 4.3.7. 1/FWHM Değeri (Kristallinite Analizi)

Mineral yapının kristalleşme oranını yansıtan 1 / FWHM değeri, OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0.0003$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res40), Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80), SHAM-(OVX+Res40), SHAM-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). İki farklı dozda resveratrol uygulanan OVX+Res40 ( $p=0.0071$ ) ve OVX+Res80 ( $p=0.0284$ ) gruplarının 1 / FWHM değerinde OVX grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir (Bknz. Şekil 9).

#### 4.3.8. GAG / Amit 3 Değeri

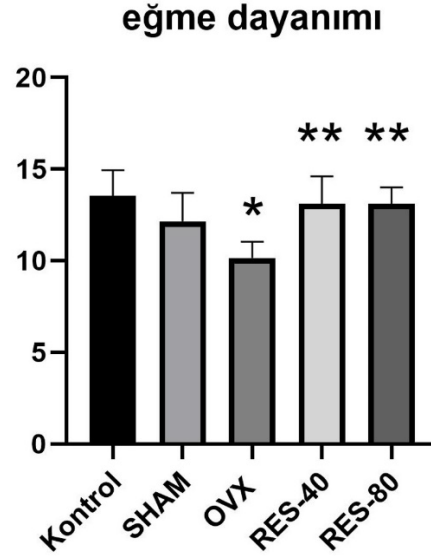
OVX gruplarında oluşan osteoporozla bağlı olarak bozulan mineralizasyon dengesiyle birlikte GAG / amit 3 değeri, OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük gözlemlenmiştir ( $p=0.0286$ ). OVX+Res40 grubunun GAG / Amit 3 değeri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülürken ( $p=0.0049$ ) SHAM grubunun GAG / Amit 3 değeri OVX+Res40 grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir ( $p=0.0006$ ). OVX+Res80 grubunun GAG / amit 3 değerinde OVX grubuna göre anlamlı bir artış görülürken ( $p=0.0157$ ) OVX+Res40 grubunun GAG / Amit 3 değeri OVX+Res80 grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir ( $p=0.0023$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res80), SHAM-(OVX+Res80), OVX-(OVX+Res40) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ( $p>0,05$ ) (Bknz. Şekil 9).

#### 4.4. Üç Nokta Eğme Testi Bulguları

Üç nokta eğme testine her gruptan 12 farklı femur dahil edilip eğme dayanımı (flexural strength) hesaplandı (Bknz. Tablo 12). OVX grubunda oluşturulan osteoporoz kemiğın kuvvet karşısında dayanımını azalttığından dolayı OVX grubunun eğme dayanımı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha düşüktür ( $p<0,0001$ ). Resveratrol tedavisi verilen OVX+Res40 ve OVX+Res80 grupları arasında anlamlı farklılığa rastlanmazken ( $p>0,05$ ) tedavi grupları olan OVX+Res40 ve



OVX+Res80 gruplarının eğme dayanım değeri OVX grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,0001$ ) (Şekil 10).



**Şekil 10** Üç Nokta Eğme (Three-point bending) Testinden elde edilen eğme dayanımı (flexural strength) değerlerinin çubuk grafiği. Kontrol (n=12), SHAM (n=12), OVX (n=12), OVX+Res40 (n=12), OVX+Res80 (n=12). Grafikteki değerler aritmetik ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir. \*Kontrol grubuna göre anlamlı fark ( $p<0,05$ ), \*\*OVX grubuna göre anlamlı fark ( $p<0,05$ ).

#### 4.5. Mikro-BT Bulguları

Mikro-BT görüntülemelerine her gruptan 12 farklı sol femur dahil edildi. BV / TV (percent volüme, kemik hacminin incelenen bölgedeki toplam hacme oranı), total volüm, Tb.N (Birim uzunluk başına düşen ortalama trabekül sayısı), Tb.Th (Doğrudan 3D ölçüm yöntemleri kullanılarak değerlendirilen trabeküllerin ortalama kalınlığı), Tb.Sp (Doğrudan 3D ölçüm kullanılarak değerlendirilen trabeküller arasındaki ortalama mesafe değerleri hesaplandı (Bknz. Tablo 12 ve Şekil 11).

##### 4.5.1. BV / TV Değeri

BV / TV değeri, OVX ve OVX+Res40 grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,0005$ ,  $p=0,0073$ ). BV / TV değeri için Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80) grupları

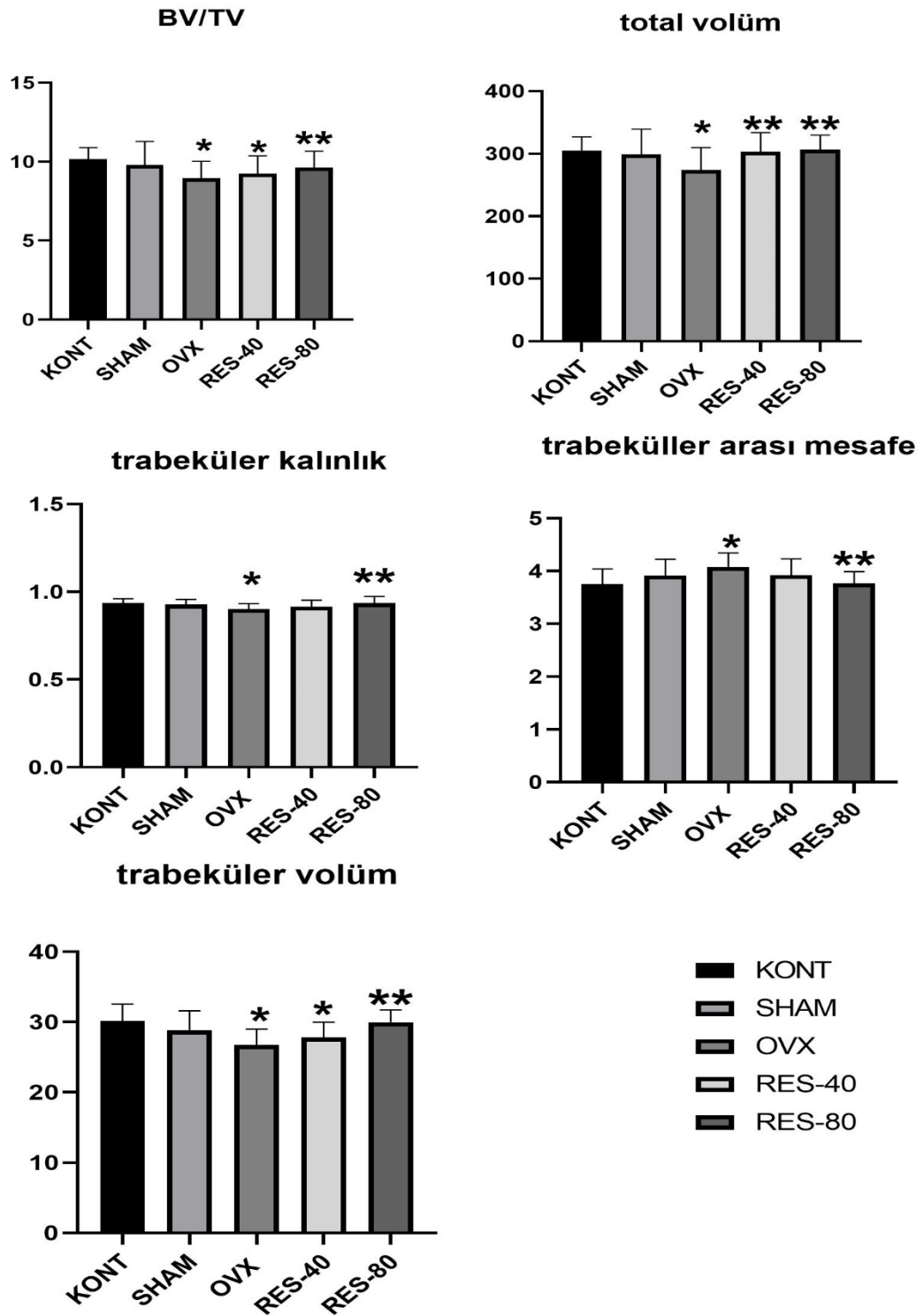
arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Sham ve OVX+Res80 grubunun BV / TV değeri, OVX grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,0106$ ,  $p=0,0439$ ) (Bknz. Şekil 11).

#### 4.5.2. Total Volüm Değeri

Total Volüm Değeri OVX grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,0385$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının total volüm değeri, OVX grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,0431$ ,  $p=0,0180$ ) (Bknz. Şekil 11).

#### 4.5.3. Trabeküler Volüm Değeri

Trabeküler volüm değeri OVX ve OVX+Res40 grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,0001$ ,  $p=0,0081$ ). SHAM grubunun trabeküler volüm değeri OVX grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,0234$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res80), OVX-(OVX+Res40) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). OVX+Res80 grubunun trabeküler volüm değeri, OVX grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,0001$ ). OVX+Res40 grubunun trabeküler volüm değeri OVX+Res80 grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,0168$ ) (Bknz. Şekil 11).



**Şekil 11** Mikro-BT parametrelerinin çubuk grafiği. Kontrol (n=12), SHAM (n=12), OVX (n=12), OVX+Res40 (n=12), OVX+Res80 (n=12). Grafikteki değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma değerlerini göstermektedir. \*Kontrol grubuna göre anlamlı fark ( $p < 0,05$ ), \*\*OVX grubuna göre anlamlı fark ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.4. Trabeküler Ortalama Kalınlık Değeri

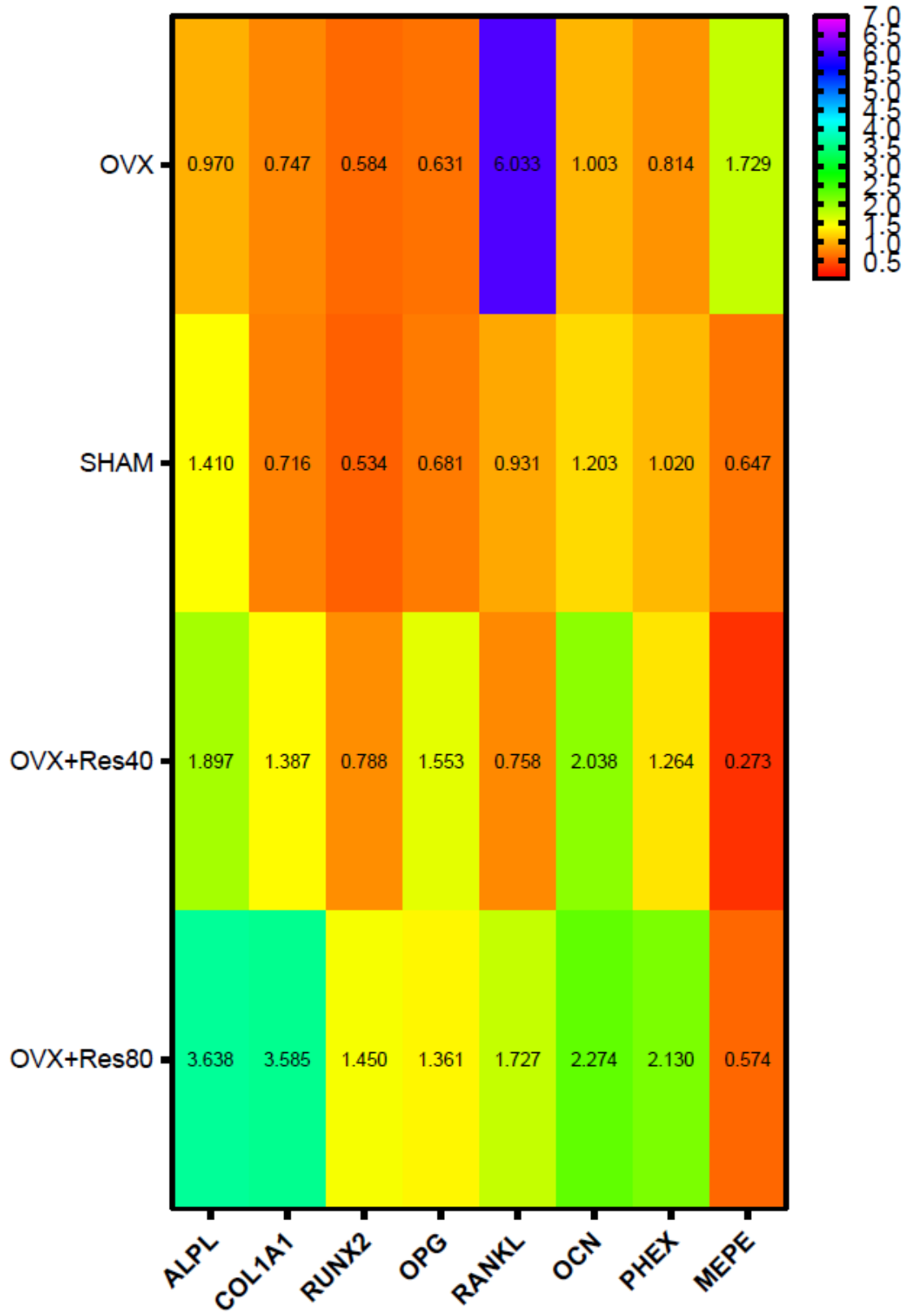
Trabeküler ortalama kalınlık değeri OVX grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,0363$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). OVX+Res80 grubunun trabeküler ortalama kalınlık değeri, OVX grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,0163$ ) (Bknz. Şekil 11).

#### 4.5.5. Trabeküller Arası Mesafe

Trabeküller arası mesafe OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ( $p=0,0031$ ). Kontrol-SHAM grupları arasında, Kontrol-(OVX+Res80), (OVX+Res40)-(OVX+Res80) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). OVX+Res80 grubunun trabeküller arası mesafesi, OVX grubundan anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,0122$ ) (Bknz. Şekil 11).

#### 4.6. RT-PCR Bulguları

RT-PCR deneyleri sonucunda osteoporoz modeli oluşturulan OVX grubunda osteojenik primerlerden ALPL, Col1a1, Runx2, OPG, OCN ve PHEX ekspresyon seviyelerinde azalma gözlendi. RANKL ve MEPE ekspresyonunun ise OVX grubunda arttığı gözlendi. Col1a1 ve Runx2 ekspresyon seviyelerinin her iki doz resveratrol grubunda arttığı, bu artışın 80 mg/kg resveratrolde daha fazla olduğu gösterildi. RANKL ekspresyonunun OVX grubunda diğer gruplardan daha yüksek olduğu, öte yandan her iki doz resveratrolün RANKL ekspresyon seviyesini azalttığı bulundu. 40 mg/kg resveratrol grubunun RANKL ekspresyon seviyesinin SHAM grubunun RANKL seviyesinden daha düşük olduğu, 80 mg/kg resveratrolün ise bu seviyeyi SHAM grubu seviyesine indiremediği saptandı. Her iki doz resveratrol grubunun OPG ekspresyon seviyesini arttırmasının yanı sıra 40 mg/kg resveratrolün 80 mg/kg'ye göre OPG ekspresyonunu daha fazla arttırdığı gösterildi. Öte yandan kemik mineralizasyon inhibitörü olan MEPE ekspresyonunun OVX grubunda artmış olduğu, her iki doz resveratrolün MEPE ekspresyon seviyesini azalttığı gösterildi. 40 mg/kg resveratrolün MEPE ekspresyonunu 80 mg/kg'ye göre daha fazla azalttığı bulundu (Şekil 12).



Şekil 12 Primerlerin gen ekspresyon seviyesinin ısı haritalandırılmasıyla gösterimi.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda overektomi yapılan sıçanlarda iki farklı dozda resveratrol (40 mg/kg/gün ve 80 mg/kg/gün) uygulamasının kemik üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Resveratrolün kemikteki etkileri hücresel düzeyde Rt-PCR deneyi ile, doku düzeyinde Raman Spektroskopisi ile, mikromimarisi Mikro-BT ile, makro yapıya yansımaları ise üç nokta eğme testi ile bütüncül olarak ortaya koyulmuştur. PMOP modelinin oluşturulması için dinamik kemik dokusuna sahip olması, doğduktan 2,5 ay sonra seksüel ve 10 ay sonra iskelet yapısının olgunlaşması, insanda oluşan PMOP sürecine benzer özelliklerinden dolayı Wistar cinsi dişi sıçan kullanılmıştır (Jee and Yao 2001, Liu, Li vd. 2015). Overektomiye karşı kemik dokuya ilişkin parametrelerin değişimini sıçan cinsleri arasında karşılaştıran literatür verisi bulunamamıştır. Bu bilgiye ek olarak, Sprague-Dawley ve Wistar cinsleri osteoporoz modeli oluşturmada yaygın olarak kullanılmakla beraber; her iki cinsten de overektomiye karşı benzer cevaplar olduğu bildirilmiştir (Yousefzadeh, Kashfi vd. 2020).

Resveratrolün overektomili sıçan kemik hücreleri üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacıyla, Rt-PCR deneyi ile kemik metabolizma belirteçleri olan ALP, OCN, RANKL, Runx2, OPG, Col1a1, PHEX, MEPE genlerinin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Resveratrolün, kemikte doku düzeyindeki etkisinin incelenmesi amacıyla Raman Spektroskopisi ile mineral/organik matriks oranı ( $v_1PO_4$  / amit 1,  $v_1PO_4$  / amit 3,  $v_1PO_4$  / prolin,  $v_1PO_4$  /  $CH_2$ ), karbonizasyon ( $CO_3$  /  $v_1PO_4$ ), kollajen olgunluğu, fibril oryantasyonu (hidroksiprolin / prolin,  $1245 / 1270 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1670 / 1640 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1670 / 1690 \text{ cm}^{-1}$ ), kristallinite ( $1 / \text{FWHM}$ ), hidratasyon özelliği (GAG / amit 3) değerlerinin analizi yapılmıştır.

Hücresel ve dokusal değişimlerin kemiğin trabeküler ve kortikal mikromimarisine yansması, ayrıca overektomiden 11 hafta sonra oluşacak osteoporoz modelinin doğrulanması için ise Mikro-BT görüntülemeleri yapılmış ve bu görüntülerden önemli parametreler hesaplanmıştır.

Sağlıklı ve osteoporotik sıçan kemiklerinde yapılan moleküler deneylerin kemiğin biyomekanik özelliklerine nasıl yansıdığı üç nokta eğme testi sonucunda elde edilen eğme dayanımı değeri hesaplanarak gösterilmiştir.

Oluşturulan osteoporoz modelinin oksidatif stres ilişkili belirteçlere etkisi ise TAS, TOS değerleri üzerinden açıklanmıştır. Postmenopozal osteoporoz modelinde resveratrolün tüm iskelet yapıya etkisini gösterebilmek amacıyla da kemik formasyon belirteçlerinden olan serum ALP ve OC seviyeleri gösterilmiştir.

Bu çalışmada, overektomi yapılan sıçanlarda iki farklı dozda resveratrol uygulandı. Resveratrolün kemiğin inorganik ve organik bileşenlerinin doku düzeyindeki özelliklerine yansımaları Raman spektroskopisi kullanılarak gösterildi. Femurun dokusal karakterizasyonunun araştırılması amacıyla  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 1,  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 3,  $\nu_1\text{PO}_4$  / prolin,  $\nu_1\text{PO}_4$  /  $\text{CH}_2$ , hidroksiprolin / prolin, 1245 / 1270  $\text{cm}^{-1}$ , 1670 / 1640  $\text{cm}^{-1}$ , 1670 / 1690  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CO}_3$  /  $\nu_1\text{PO}_4$ , GAG / amit 3, 1 / FWHM bant oranları hesaplandı.  $\text{CO}_3$  bandının (1020  $\text{cm}^{-1}$ -1100  $\text{cm}^{-1}$ ) proteoglikan (~1060  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_3\text{PO}_4$  (~1045  $\text{cm}^{-1}$ ) bantları ile üst üste çakışma olasılığı nedeniyle bant oranlarının hesaplanmasında kemiğin kimyasal özelliklerine daha hassas olan pik yoğunluk yöntemi kullanıldı (Unal, Ahmed vd. 2021). Kemikte denatürasyon oluşmadığı sürece Raman spektroskopisi ile elde edilen kollajen ilişkili parametrelerin tekrarlı ölçümler sonucunda değişmediği gösterilmiştir (Unal, Jung vd. 2016). Bu da Raman spektra verilerinin zamandan bağımsız olarak stabil olduğunu göstermektedir. Kemikte mineral/matriks oranı osteoporoz gibi kemik patolojilerinde azalır (Paschalis, Gamsjaeger vd. 2017) (Paschalis, Gamsjaeger vd. 2017). OVX grubunun  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 1,  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 3,  $\nu_1\text{PO}_4$  / prolin değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Fakat resveratrol verilen OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 1,  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 3,  $\nu_1\text{PO}_4$  / prolin değerleri ise OVX grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu çalışmadaki  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 1,  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 3,  $\nu_1\text{PO}_4$  / prolin bandı bulgularına göre overektominin sıçan kemik dokusunda lokal bazda mineralizasyon miktarını negatif yönde etkilediği, 40 mg/kg/gün ve 80 mg/kg/gün doz resveratrolün overektominin kemik dokuda oluşturacağı mineral / matriks oranındaki düşüşün önüne geçtiği gösterilmiştir.  $\nu_1\text{PO}_4$  /  $\text{CH}_2$  oranında ise diğer mineral/matriks değerlerine göre deney grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Öte yandan  $\text{CO}_3$  /  $\nu_1\text{PO}_4$  değeri için gruplar arası anlamlı farklılık yoktur. McCreadie ve ark., osteoporozun kortikal kemik dokusunda  $\text{CO}_3$  /  $\nu_1\text{PO}_4$  değerini arttırdığını göstermiştir (McCreadie, Morris vd. 2006). Bu da osteoporozun kemik dokuda mineral kristal boyutunu değiştirdiğini göstermektedir. Mineral kristal yapısında  $\text{CO}_3$  yerleşimi arttıkça kristal yapı boyutunun küçüldüğü, bunun sonucunda mineral ve

kollajen etkileşiminin azaldığı belirtilmiştir.  $CO_3$  yerleşimi hidroksiapatit kristal yapısında atomik düzensizliği artırıp kristal gelişimini azaltarak, kemiğin mineral kristal yapısını değiştirir (Unal, Creecy vd. 2018). Mineral ve kollajen etkileşiminin azalmasının, kemik tokluğu üzerinde negatif etki gösterdiği, azalmış tokluğun ise kemiğe daha kırılğan bir karakter kazandırdığı belirtilmiştir (Unal, Creecy vd. 2018). Kemik organik matriksinden özellikle tip 1 kollajen içeriğinin tokluk özelliği ile ilişkili olduğu göz önüne alındığında  $CO_3$  yerleşiminin tokluk ve akma sonrası tokluk özelliği arasında negatif bir ilişkide olması kemiğin biyomekanik karakterinin yalnızca mineral ya da organik matriks yönünden ele alınmaması gerektiğini vurgulamaktadır (Unal 2021). Bu açıdan çalışmamızda kemiğin organik ve inorganik komponentleri bütüncül bir bakış açısıyla ortaya koyulmuştur.

Perimenopozal dönemde olan kadınlarda yapılan bir çalışmada hormon replasman tedavisinin kemik mineral yoğunluğunu arttırmasının yanı sıra mineral kristal boyutunu azalttığı belirtilmiştir (Faibish, Ott vd. 2006). Raman spektroskopisi bulgularımız ışığında  $CO_3 / \nu_1PO_4$  ve  $1 / FWHM$  analizlerine göre düşük ve yüksek doz resveratrolün overektomili sıçan kemiğinde mineral kristal boyutunu değiştirmeden kristal olgunluğunu arttırdığı ve bu etkiyi de mineral-kollajen etkileşimini engellemeden yaptığı görülmektedir.

Çalışmamızda overektominin kollajenin konformasyonel yapısı üzerine etkisi amit 1 ve amit 3 ilişkili bantlarla gösterilmiştir. OVX grubunda kontrol grubuna göre Amit 1 ilişkili bantlardan 1670 / 1640 değeri anlamlı derecede yüksek olmasına rağmen 1670 / 1690 değerinin anlamlı derecede düşük olması overektominin kemikte kollajenin üçlü helikal yapısını bozduğunu, kollajen molekülleri arasındaki rastgele kıvrılmaları arttırarak kollajen denatürasyonuna yol açtığını göstermektedir. OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının 1670 / 1640 değeri ise OVX grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmasına rağmen 1670 / 1690 değeri OVX+Res40 grubunda OVX grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. Amit 3 ilişkili 1245 / 1270 değerinin OVX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek, OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarında OVX grubuna göre anlamlı derecede düşük olması, 1670 / 1640 bulgularını desteklemektedir (Bknz. Şekil 9). Çalışmamızın amit 1 ve amit 3 alt bant bulgularına göre her iki dozda uygulanan resveratrolün overektominin kollajen yapısal organizasyonunda oluşturduğu negatif değişimin önüne geçtiği görülmektedir. Çalışmamızda 1670 / 1690 bulgularına göre overektominin sağlıklı sıçan kemiğinde kollajen molekülleri arasındaki olgun enzimatik bağ oranını düşürdüğü, sonuçta matriks olgunluğunu azalttığı gösterilmiştir. Kollajen moleküllerindeki olgunlaşmanın azalması 40 mg/kg/gün dozda resveratrol uygulaması ile engellenirken, 80 mg/kg/gün uygulanan grupta bu etki bulunamamıştır. 1245 / 1270 değeri kollajen fibril oryantasyonu hakkında bilgi verir (Unal, Jung vd. 2016).



1245 / 1270 değeri için her iki doz resveratrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Kemik dokunun organik ve inorganik matriks içeriğinin incelenmesinin yanında mineral ve kollajen ilişkili su moleküllerinin dağılımının incelenmesi kemiğin dokusal karakterizasyonu ile birlikte biyomekanik özelliklerini de yansıtmaktadır. Kemik dokuda su moleküllerinin dağılımının incelenmesi, osteoporoz gibi yaşlı popülasyonu etkileyen global bir sağlık sorununda kırık riskinin öngörülmesi açısından önem arz eder. Bu probleme yönelik olarak Nyman ve ark., kortikal kemik dokusunda değişken sıcaklıklarda yaratılan dehidratasyonun üç nokta eğme testi ile elde edilen mekanik özellikleri (strength, stiffness, toughness) etkilediğini ileri sürmüştür, kemik dokudaki su molekülleri dağılımının sadece kanaliküler-laküner formda olmadığını, ayrıca kollajen ve mineral apatit yapılarında da bulunan formları olduğunu göstermiştir (Nyman, Roy vd. 2006).

Mineral/matriks oranı, kristallinite, kollajen kalitesi gibi geleneksel Raman Spektroskopi parametrelerinin yanında GAG / Amit 3, hidroksiprolin / prolin gibi yeni parametrelerin de kemiğin mekanik özellikleri ile korelasyonları mevcuttur. GAG'lar kemik organik matriksi içerisindeki nonkollajenöz proteinlerden olan proteoglikanlara bağlı tekrarlı disakkarit birimlerinden oluşan polimerlerdir (Gamsjaeger, Klaushofer vd. 2014). GAG'lar negatif yüke sahip olduğundan osmotik etki yoluyla suya karşı potansiyel bir affinite özelliği gösterir (Han, Gomez vd. 2021). Gamsjaeger ve ark., Raman spektroskopisi ile kemikte rölatif proteoglikan içeriğini 1375 / amit 1 ve 1375 / amit 3 bant oranlarının temsil ettiğini göstermiştir (Gamsjaeger, Klaushofer vd. 2014). Mandair ve Morris ise 1060  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunun proteoglikan molekülleri ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Mandair and Morris 2015). 1060  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunun lipit, kollajen,  $\text{CO}_3$  pikleri ile çakışabileceği yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (Mandair and Morris 2015) (Unal, Ahmed vd. 2021). FTIR bandında proteoglikanların genel olarak 1060  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda incelendiği gösterilmiştir (Taylor and Donnelly 2020). ~1375  $\text{cm}^{-1}$  pikinin predominant olarak GAG moleküllerinden kaynaklanan vibrasyonla ilişkili olması nedeniyle bu çalışmada nonkollajenöz proteinler için 1375  $\text{cm}^{-1}$  piki referans olarak alınmıştır.

Kemikte GAG kaybı dokuya bağlı su moleküllerinin kaybı ile ilişkili olup; bu kayıp kemiğin tokluk özelliği üzerinde negatif etki gösterir (Surowiec, Allen vd. 2022). Unal ve ark.'nın yaptığı çalışmada GAG'lar gibi matriks proteinlerinin su molekülleri ile olan bağının, kemiğin mekanik olarak akma sonrası davranışını etkilediği bulgusu Surowiec ve ark.'nın (Surowiec, Allen vd. 2022) bulgusunu desteklemektedir (Unal, Creecy vd. 2018). Çalışmamızda OVX grubunun GAG / amit 3 değerinin, kontrol grubuna kıyasla

anlamli derecede düşük bulunmasi, sicanlarda olusturulan osteoporoz modelinin GAG degerini tum organik matrikse gore azalttiği anlaşılmaktadır. Yüksek doz resveratrol uygulamasının (80 mg/kg/gün) kontrol ve SHAM grubu ile arasında anlamlı bir fark olmaması, OVX grubunun GAG / amit 3 degerinden anlamlı derecede yüksek olması kemikte organik matriksteki nonkollajenöz protein içeriğini kontrol ve SHAM grubu seviyesinde arttırdığını göstermektedir. Yüksek doz resveratrol uygulamasının kemikte GAG / amit 3 degerini arttırmasına rağmen, düşük doz resveratrol (40 mg/kg/gün) uygulamasının OVX grubunun GAG / amit 3 degerinden anlamlı farklılığı olmaması dikkat çekmektedir. OVX+Res40 grubunun GAG / amit 3 degerinin, sağlıklı kontrol grubundaki GAG / amit 3 degerinden anlamlı derecede az olması, overektomili sicanlarda 40 mg/kg/gün uygulanan resveratrolün kemik organik matriksinde nonkollajenöz protein oranını negatif etkilediği, bunun sonucunda da kemik dokunun suya karşı affinitesini azalttığı söylenebilir. Ayrıca OVX+Res40 grubunun GAG / amit 3 degerinin OVX grubundan anlamlı farklılığının olmaması, resveratrolün organik matriksteki GAG oranı üzerindeki etkisinin doza bağlı olduğunu göstermektedir.

Mineral kristalleşme parametresi olan  $1 / \text{FWHM}$  analizleri sonucunda overektomiden 11 hafta sonra sican kemik dokusunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla OVX grubunda kristalleşme degeri anlamlı derecede düşüktür. Uygulanan her iki doz resveratrolün overektomi sonrası mineral yapının kristalleşmesi üzerine kontrol düzeyinde bir artış sağladığı gösterilmiştir. Shah ve ark.'ları, overektomiden 4 ve 8 hafta sonrası sican kemiğinde mineral kristalleşme parametresinin değişmediğini, sağlıklı kontrol grubunda ise yaşa bağlı kristalleşmenin arttığını göstermiştir (Shah, Stoica vd. 2018). Aynı çalışmada overektomi sonrası  $\text{CO}_3 / \nu_1\text{PO}_4$  oranındaki artışın mineral yapıdaki  $\text{CO}_3$  ve  $\text{PO}_4$  yer değişiminin artması ile ilişkili olduğu, bu artışın mineral kristalleşmesi üzerine negatif etkisi olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı kemikte kristal büyüklüğü ve şeklinin belirli bir aralıkta olması gerekmektedir. Osteoporotik kemikte bu aralıktan sapmalar oluşur. Paschalis ve ark., mineral olgunluğu/kristalleşmenin deneye dahil edilen kemiğin doku yaşına ve deneğin yaşına bağlı olduğunu belirterek Shah ve ark.'nın kristalleşmenin yaşa bağlı değiştiği bulgusunu desteklemektedir (Paschalis, Gamsjaeger vd. 2017). Çalışmamızda  $1 / \text{FWHM}$  ve  $\text{CO}_3 / \nu_1\text{PO}_4$  bulgularına göre postmenopozal osteoporozun kemikte mineral kristal boyutunu değiştirmeden, kristalleşme oranını azalttığı ortaya koyulmuştur (Bknz. Şekil 9). OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının  $1 / \text{FWHM}$  ve  $\text{CO}_3 / \nu_1\text{PO}_4$  bulgularına göre her iki doz resveratrolün overektomi kaynaklı azalacak mineral kristalleşmesinin önüne geçtiği, bu etkiyi kontrol grubu seviyesinde yaptığı görülmektedir.

Osteoporoz teşhisinde altın standart olarak kabul edilen dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) kemik mineral yoğunluğu (BMD) ölçümünde kullanılan yaygın bir tekniktir. DEXA, osteoporoz teşhisinin yanı sıra tedavi etkinliğinin ölçümünde de kullanılan bir teknik olsa da anatomik olarak trabeküler ve kortikal kemik ayrımını yapamaz (Yousefzadeh, Kashfi vd. 2020). Kemik kırıklarının yarısından fazlası DEXA'da osteoporoz sınıflandırmasına girmeyen BMD değerine sahiptir (Yousefzadeh, Kashfi vd. 2020). Bu da kemiğin kırık dayanımının sadece BMD'ye bağlı olmadığını, trabeküler ve kortikal mikromimarinin de kemik dayanımı ile ilişkili olduğunu gösterir. Kemiğin morfolojik ve mikromimari yapısının araştırılması, kemiğin kalitesini ve dayanımını ortaya koyar. Trabeküler kemik mikromimarisi, kemik kalitesi ve dayanımının önemli komponentlerinden olup; BV / TV, Tb.Th, Tb.Sp osteoporoz etkilerinin gösterilebileceği en önemli trabeküler yapı parametreleridir (Hsu, Chen vd. 2014). İnsana kıyasla daha küçük kemiğe sahip olan sıçan ve fare gibi deney hayvanlarında kemik mikromimarisinin incelenmesinde genel olarak Mikro-BT yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir (Bouxsein, Boyd vd. 2010). Overektomiden sadece iki hafta geçtikten sonra bile sıçan trabeküler kemik yapılarında oluşan kalıcı kayıp Mikro-BT yöntemi ile gösterilebilmiştir (Bouxsein, Boyd vd. 2010). In vivo Mikro-BT uygulanabilirlik ve maliyet açısından avantajlı bir yöntem olsa da genç-gelişme döneminde olan sıçanlar için iyonize radyasyona maruz kalım, farklı dokulardaki proliferatif süreçlerde farklı yanıtlar oluşturabilir. Klinck ve ark., 12 haftalık overektomili sıçanlarda haftalık Mikro-BT görüntülemesinin trabeküler kemik volümünü %8-20 arası azalttığını göstermiştir (Klinck, Campbell vd. 2008).

Çalışmamızda Mikro-BT görüntülemeleri, proliferatif biyolojik süreçleri etkilememek ve deney hayvanında harekete bağlı oluşacak artefaktların engellenmesi amacıyla sıçanlar sakrifiye edildikten sonra bir defa yapılmıştır. Her gruptan 12 adet olmak üzere toplam 60 femur dahil edilmiştir. BV / TV (percent volüme, incelenen bölgedeki toplam kemik hacmine göre trabeküler kemik yüzde oranı), total volüm (incelenen bölgedeki toplam kemik hacmi), trabeküler volüm (incelenen bölgedeki trabeküler kemik hacmi), Tb.Th (Doğrudan 3D ölçüm yöntemleri kullanılarak değerlendirilen trabeküllerin ortalama kalınlığı), Tb.Sp (Doğrudan 3D ölçüm kullanılarak değerlendirilen trabeküller arasındaki ortalama mesafe) değerleri hesaplanmıştır.

Osteoporoz, kemiğin kortikal ve trabeküler mikromimarisinde değişiklik oluşturarak kemiğin kırık dayanımını, organ düzeyinde morfolojik özelliklerini etkiler. Overektomiden 11 hafta sonra total volüm değerinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olması osteoporozun sıçan femurunda toplam hacme negatif etkisi olduğunu gösterir. Total volüm bulgularına göre her iki doz resveratrolün overektomili

sıçan femurunda total volüm değerini arttırdığı, bu artışı da kontrol seviyesinde yaptığı gösterildi (Bknz. Şekil 11). Osteoporozun etkileri trabeküler kemikte anatomik yapıdan kaynaklanan farklılıklar ve daha fazla remodelizasyon aktivitesine sahip olması nedeniyle kortikal kemiğe göre daha çarpıcıdır. Jiang ve ark., OVX grubunun BV / TV, Tb.N değerlerinin azalıp, Tb.Sp değerinin artmasıyla osteoporozun trabeküler kemikte oluşturduğu etkiyi ortaya koymuştur (Jiang, Luo vd. 2020). Aynı çalışmada 40 mg/kg resveratrolün fare femurunda Tb.Sp değerini azaltıp, Tb.N ve BV / TV değerini arttırarak osteoporozun trabeküler kemikte oluşturacağı etkileri tersine çevirdiği gösterilmiştir. 40 mg/kg resveratrolün osteoporotik sıçan femurunda BV / TV, Tb.N, Tb.Th'yi arttırdığı Feng ve ark. tarafından gösterilse de çalışmamızın BV / TV bulguları, 40 mg/kg resveratrolün diğer trabeküler kemik parametrelerinde anlamlı etkisi olmasına karşın BV / TV değerini arttırmadığını göstermiştir (Feng, Jiang vd. 2018). Resveratrolün genç sıçanlarda BV / TV üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığı farklı çalışmalarda da gösterilmiştir (Lee, Shandala vd. 2014).

Çalışmamızdan farklı olarak Feng ve ark.'nın, 40 mg/kg resveratrolü susam yağında çözmüş olması, sıçanların kilosuna gibi faktörler BV / TV değerini etkilemiş olabilir. Liu ve ark.'nın çalışmasında osteoporotik sıçan femurunda BV / TV, BMD değerlerinin azaldığı görülmektedir (Liu, Zhang vd. 2018). Çalışmamızın BV / TV bulgularına göre, OVX grubunda osteoporozla bağlı trabeküler kemik volümü azalmıştır (Bknz. Şekil 11). Ayrıca OVX+Res40 grubunun OVX grubundan istatistiksel olarak farkının olmaması, düşük doz resveratrolün overektomili sıçan kemiğinde BV / TV değerini etkilemediğini gösterir. Düşük doz resveratrolün osteoporozla karşı kemiğin total volümünü koruyucu etkisi olsa da bu etki trabeküler volüm bulgularına yansımamıştır. 40 mg/kg resveratrolün trabeküler volümü artırıcı etkisinin olmaması, BV / TV bulgularına yansımıştır. Yüksek doz resveratrolün (80 mg/kg/gün) overektominin trabeküler kemik yüzde oranı üzerinde oluşturduğu etkiyi tersine çevirdiği OVX+Res80 grubunun BV / TV değerinin OVX grubundan anlamlı derecede yüksek olmasının açık nedenidir. OVX+Res80 grubunun, kontrol grubundan anlamlı farkı olmaması, yüksek doz resveratrolün trabeküler kemik yüzdesi üzerindeki etkiyi kontrol seviyesinde gerçekleştirdiğini gösterir. Benzer şekilde Zhao ve ark., 40 mg/kg ve 80 mg/kg resveratrolün overektomi kaynaklı oluşan trabeküler kemik kaybını azalttığını göstermiştir (Zhao, Li vd. 2014).

Yapılan başka çalışmalarda BV / TV değerinin cinsler arası genetik farklılıklar, üreme öyküsüne sahip olma gibi faktörlerden etkilendiği ortaya koyulmuştur (Li, Tseng vd. 2021). Overektomi sonrası kemik kayıp oranının dış faktörlerden etkilenmemesi amacıyla çalışmamızda üreme hikayesi olmayan, 12 haftalık dişi Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Gruplar arası BV / TV değeri, kemik mikroyapısını yansıtan Tb.Sp, Tb.Th

değerleri ile birlikte ortaya koyulmuştur. Tb.Th değeri, osteoporoz modeli oluşturulan OVX grubunda kontrol grubuna göre azalmış, yüksek doz resveratrol tedavisi overektomi kaynaklı Tb.Th değerindeki azalmayı önlemiştir. Li ve ark., daha az sayıda fakat daha kalın fenotipte trabeküler kemiğin osteoporoz kaynaklı kemik kaybına karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiş, Tb.Th değerinin osteoporoza bağlı kemik kaybını saptamakta BV / TV değerine göre daha hassas olduğunu ortaya koymuştur (Li, Tseng vd. 2021). Aynı çalışmada overektomiden 4 hafta sonra BV / TV, Tb.N, Tb.Th değerlerinin azaldığı, Tb.Sp değerinin arttığı gösterilerek osteoporozun trabeküler yapıya etkileri ortaya koyulmuştur. Li ve ark.'nın çalışmasının overektomiden sadece 4 hafta sonra yapılan Mikro-BT bulgularına dayanması, çalışmanın erken PMOP süreciyle sınırlandığını göstermektedir. Çalışmamızın Tb.Th bulguları mevcut literatür verileri ile uyumlu olsa da Li ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak Mikro-BT görüntülemeleri overektomiden 11 hafta sonra gerçekleştirilmiştir. PMOP'nin trabeküler kalınlığa bağlı trabeküller arası konnektiviteyi negatif etkilemesi, Tb.Th artışının kemikte oluşacak yapısal hasara karşı koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda yüksek doz resveratrolün overektomili sıçan kemiğinde Tb.Th değerini arttırdığı, bu etki ile 80 mg / kg resveratrolün postmenopozal osteoporoza karşı koruyucu etkisi olabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızın tüm Mikro-BT bulguları, kemiğin mekanik bütünlüğünü sağlayan belirteçler olup, 80 mg/kg resveratrol uygulamasının trabeküler kemik mikromimarisinin korunmasını sağladığı göstermektedir.

Jiang ve ark., 40 mg/kg resveratrolün osteoporotik fare kemiğinde osteojenik belirteçlerden olan ALP ve Runx2 rölatif ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (Jiang, Luo vd. 2020). Bu da osteoporozun ALP ve Runx2 ekspresyon seviyesinde oluşturacağı azalmanın resveratrol tarafından engellendiğini göstermektedir. Başka bir çalışmada osteojenik belirteçlerden olan ALP, Runx2 ve OCN rölatif mRNA seviyelerinin OVX grubunda SHAM grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Liu, Zhang vd. 2018). Çalışmamızda ALP, Runx2, OCN rölatif ekspresyon seviyelerinin osteoporotik sıçan kemiğinde azalmış olması, her iki doz resveratrolün bu osteojenik primer ekspresyonları arttırdığı bulgusuna dayanılarak osteoporozun osteoblastik aktivite üzerinde negatif etkisi olduğu, 40 ve 80 mg/kg resveratrolün bu negatif etkiyi tersine çevirdiğini ortaya koymaktadır. PMOP'li sıçanlarda 40 mg/kg resveratrolün OPG (osteoklastogenez inhibitör faktörü), RANKL üretimi araştırılarak overektominin OPG seviyesini azaltıp RANKL seviyesini arttırdığı, OPG/RANKL değerinin azaldığı, resveratrolün overektomi kaynaklı değişimleri tersine çevirdiği fakat SHAM seviyesinde yapamadığı gösterilmiştir (Feng, Jiang vd. 2018). 6 aylık sağlıklı sıçanlarda 3 ay boyunca 20 mg/kg resveratrolün OCN mRNA ekspresyon seviyesini %50 azalttığı gösterilmiştir (Lee, Shandala vd. 2014).

Başka bir çalışmada 40 ve 80 mg/kg resveratrolün osteoporotik sıçan femurunda OPG ekspresyonunu arttırdığı RANKL ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Zhao, Li vd. 2014). Zhao ve ark.'nın çalışması, 40 ve 80 mg/kg resveratrolün RANK/RANKL yolağı üzerinden kemik rezorpsiyonunu inhibe edici etkisi olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda RANKL ekspresyonunun OVX grubunda artması, bunun yanı sıra OPG ekspresyonunun OVX grubunda azalmış olması osteoporozun artmış kemik metabolizması ile karakterize bir patoloji olduğunu ortaya koymaktadır. Öte yandan OVX+Res40 grubunun RANKL rölatif ekspresyon seviyesinin OVX+Res80 grubundan düşük olması overektominin kemik dokuda oluşturacağı artmış osteoklastik aktivitenin engellenmesinde 40 mg/kg resveratrolün daha etkin olacağını göstermektedir. Çalışmamızdaki 40 mg/kg resveratrolün OPG ekspresyon seviyesini 80 mg/kg 'ye göre daha fazla arttırmış olması, mevcut RANKL ekspresyon bulgularımızla birlikte değerlendirildiğinde 40 mg/kg resveratrolün OPG/RANKL yolağı üzerinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca 40 mg/kg resveratrolün osteoblast hücreleri tarafından üretilen ve RANKL-RANK etkileşimini inhibe ederek kemik rezorpsiyonunu engelleyen OPG ekspresyonunu arttırması, resveratrolün osteoblastik aktivasyonu stimüle ettiğini, RANKL ekspresyonunu azaltarak osteoklastogenezisi inhibe edici etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Col1a1 ekspresyon seviyesinin OVX grubunda azalmış olması, bu durumun aksine her iki doz resveratrolün Col1a1 ekspresyonunu arttırması osteoporozun kollajen gen ekspresyonu üzerinde negatif etkisi olduğunu, 40 ve 80 mg/kg resveratrolün overektomi ile birlikte oluşacak bu etkiyi tersine çevirdiğini göstermiştir. Başka bir çalışmada 40 mg/kg resveratrolün overektomili sıçan osteoblastlarında Col1a1 protein miktarını arttırdığı, osteoklastlarda ise RANKL protein miktarını azalttığı ortaya koyularak resveratrolün sadece osteoblastik diferansiasyonu indüklemekle kalmayıp, osteoklastik diferansiasyonu inhibe edici etkisinin olması Col1a1 ve RANKL bulgularımızı desteklemektedir (Wang, Zhang vd. 2020). Çalışmamızda OVX grubunda PHEX ekspresyonu azalmış, MEPE ekspresyonu artmış bulundu. PHEX rölatif ekspresyonundaki azalma, PMOP'un fosfat atılımını arttırarak kemik mineralizasyonunu olumsuz etkilemiştir. Bunun yanında MEPE ekspresyonunun OVX grubunda artması, osteoporozun kemik formasyonunu ve mineralizasyonunu inhibe edici etkisini ortaya koymuştur.

Osteoporoz gibi patolojilerde kemik kırılabilirliğini azaltmanın farklı yolları vardır. Bunlardan kemik kütlesinin arttırılması ya da kemik kütlesinin mekanik olarak yüklenmenin en yoğun olduğu bölgelere dağıtılması kemiğin organ düzeyinde yani ekstrinsik biyomekanik özelliklerini etkileyen stratejilerdir (Turner 2002). Osteoporotik kemikte ekstrinsik biyomekanik özelliklerin geliştirilmesinin yanı sıra doku düzeyindeki

özelliklerde hasar oluşmaması efektif bir tedavi için anahtar faktördür. Kemikte intrinsik (doku düzeyinde) ve ekstrinsik (organ düzeyinde) biyomekanik özelliklerin geliştirilmesini hedefleyen kombine bir ilaç tedavisine nadir rastlanmaktadır. Fluorid tedavisinin kemik kütlesini arttırdığı, öte yandan elastisite modülü, maksimum stres gibi intrinsik biyomekanik özelliklere negatif etki gösterdiği, sonuçta kemik dayanımını azalttığı bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Rezaee, Bouxsein vd. 2020, Helte, Donat Vargas vd. 2021). Osteoporozda kullanılan terapötik ajanlar antirezorptif ve anabolik olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılır. Bifosfonat gibi antirezorptif ajanların kullanımı, kemikte azalan remodelizasyona bağlı olarak mineralizasyonun artmasına neden olur (Turner 2002). Kemikte meydana gelen hipermineralizasyon, kemiğin ekstrinsik biyomekanik özelliklerinden olan katılığı (stiffness) artırıp, nihai yer değiştirme (ultimate displacement) miktarının azalmasına neden olur. Antirezorptif ajan kullanımının BMD'yi arttırarak kemik kütlesini arttırıcı etkisinin yanı sıra kemiğin kırılma yatkınlığını da arttırdığı gösterilmiştir (Black, Condra vd. 2022). Antirezorptif ajanların yanı sıra parathormon (PTH) gibi kemikte anabolik etki oluşturan ajanların remodelizasyonu stimüle ederek, kemiğin ekstrinsik biyomekanik özelliklerini geliştirdiği ortaya koyulmuştur (Wu, Cai vd. 2018). PTH, her ne kadar osteoanabolik bir ajan olarak sınıflandırılrsa da dozaj ve uygulanma sıklığına bağlı olarak RANK/RANKL yolu üzerinde indirekt etki ile osteoklastların aktivasyonunu da sağlar (Leiblein, Henrich vd. 2020). PTH'ın bahsedilen bu ikili etkisi, kemikte hipermineralizasyona sebep olmadan kemik dayanımını arttırdığını göstermiştir. Çalışmamızda antirezorptif ve anabolik etkiye sahip olan resveratrolün kemiğin biyomekanik karakteri üzerine olan etkisi eğme dayanımı hesaplanarak gösterilmiştir (Niwano, Kohzaki vd. 2022). Üç nokta eğme testi bulgularımıza göre overektominin sıçan femurunda eğme dayanımını azalttığı ve dolayısıyla kemiğin kuvvet karşısında zayıfladığını ortaya koymaktadır. Öte yandan resveratrol verilen OVX+Res40 ve OVX+Res80 gruplarının eğme dayanımının OVX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı görülmektedir. Bu da önleyici tedavi amaçlı uygulanan iki farklı doz resveratrolün kemik dokuda dayanıklılığı artırarak kemik dokuda overektominin yarattığı olumsuz etkileri ortadan kaldırdığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın Raman spektroskopisi  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 1,  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 3,  $\nu_1\text{PO}_4$  / prolin değerlerinin OVX grubunda azalması mineralizasyonun olumsuz etkilendiğini göstermektedir. RT-PCR sonuçlarından PHEX ekspresyonunun azalıp MEPE ekspresyonunun artmış olması overektominin kemik mineralizasyonu üzerindeki olumsuz etkilerinin moleküler seviyeye yansıdığını göstermiştir. Amit 1 ve amit 3 alt bant sonuçlarına göre her iki dozda uygulanan resveratrolün overektominin kollajen yapısal

organizasyonunda oluşturduğu negatif değişimin önüne geçtiğini göstermiş olup, resveratrolün kollajen üzerindeki olumlu etkisi Col1a1 rölatif ekspresyon seviyesine yansımıştır. Üç nokta eğme test sonuçlarına göre her iki doz resveratrol uygulamasının overektomili sıçan kemiğinde eğme dayanımını arttırarak, kemikte makro olarak düzelme sağladığı gösterilmiştir. Kemiğin biyomekanik özelliği üzerinde 40 ve 80 mg/kg resveratrolün birbirine göre anlamlı üstünlüğü gösterilememiştir. Öte yandan 80 mg/kg resveratrolün overektominin oluşturduğu trabeküler mikromimarideki hasarı 40 mg/kg resveratrole göre daha etkin önlediği ortaya koyulmuştur. Hem Raman spektroskopisi bulgularında hem de RT-PCR sonuçlarında bazı parametrelerde 40 mg/kg resveratrolün daha etkin olduğu bulunmuşken; bazı parametrelerde 80 mg/kg 'nin daha etkin olduğu bulundu. Elde ettiğimiz veriler işığında hangi resveratrol dozunun daha önleyici etkisi olduğu kanısına varmak mümkün değildir. Bu sebeple, daha detaylı resveratrol doz çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.



## 6. SONUÇ

Çalışmamızda overektomi sonrası kemikte gelişen hasarı önlemeye yönelik 40 ve 80 mg/kg resveratrol tedavisi uygulandı. Kemik dokuda makro düzeyde meydana gelen değişimler üç nokta eğme testi ile gösterilmiş olup elde edilen veriler ışığında 40 ve 80 mg/kg resveratrolün kemiğin makro mekanik özelliklerini geliştirdiği sonucuna varılmıştır.

Mikro-BT yöntemiyle elde edilen veriler ışığında overektomiden 11 hafta sonra sıçan kemik dokusunda osteoporoz geliştiği gösterildi. 80 mg/kg resveratrol verilen gruplarda BV/TV, total volüm, trabeküller kalınlık ve trabeküler volüm değerlerinin arttığı ve bununda overektominin meydana getirdiği hasarı önlediği sonucuna varılmıştır.

Kemik dokunun fiziko-kimyasal özellikleri Raman spektroskopisi yöntemiyle ortaya koyulmuş olup 80 mg/kg resveratrol verilen gruplarda  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 1,  $\nu_1\text{PO}_4$  / amit 3,  $\nu_1\text{PO}_4$  / prolin ve 1 / FWHM değerlerinde artış olduğu ve bununda kemik dokunun fiziko-kimyasal özelliklerini geliştirdiği sonucuna varılmıştır.

Kemik yapım mekanizmalarında etkin olarak rol oynayan ALP, OCN, Runx2, OPG ve PHEX'in gen ekspresyon düzeyleri 40 ve 80 mg/kg resveratrol tedavisi verilen gruplarda artmıştır.

Elde edilen bu sonuçlar ışığında resveratrolün postmenopozal osteoporozu önlemeye yönelik etkin bir tedavi seçeneği olacağı ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda gösterilen bu etki mekanizmalarının aydınlatılması için gelecekte daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- Anh, D. J., A. Eden and J. R. Farley (2001). "Quantitation of soluble and skeletal alkaline phosphatase, and insoluble alkaline phosphatase anchor-hydrolase activities in human serum." Clin Chim Acta **311**(2): 137-148.
- Ansari, S., B. W. M. de Wildt, M. A. M. Vis, C. E. de Korte, K. Ito, S. Hofmann and Y. Yuana (2021). "Matrix Vesicles: Role in Bone Mineralization and Potential Use as Therapeutics." Pharmaceuticals (Basel) **14**(4).
- Arıncı K, E. E. (1995). Anatomi, Güneş Kitabevi.
- Bagi, C. M., M. Mecham, J. Weiss and S. C. Miller (1993). "Comparative morphometric changes in rat cortical bone following ovariectomy and/or immobilization." Bone **14**(6): 877-883.
- Baile, C. A., J. Y. Yang, S. Rayalam, D. L. Hartzell, C. Y. Lai, C. Andersen and M. A. Della-Fera (2011). "Effect of resveratrol on fat mobilization." Ann N Y Acad Sci **1215**: 40-47.
- Beattie, J. R., A. Sophocleous, M. C. Caraher, O. O'Driscoll, N. M. Cummins, S. E. J. Bell, M. Towler, A. Rahimnejad Yazdi, S. H. Ralston and A. I. Idris (2019). "Raman spectroscopy as a predictive tool for monitoring osteoporosis therapy in a rat model of postmenopausal osteoporosis." J Mater Sci Mater Med **30**(2): 25.
- Bessette, L., L. G. Ste-Marie, S. Jean, K. S. Davison, M. Beaulieu, M. Baranci, J. Bessant and J. P. Brown (2008). "The care gap in diagnosis and treatment of women with a fragility fracture." Osteoporos Int **19**(1): 79-86.
- Black, D. M., K. Condra, A. L. Adams and R. Eastell (2022). "Bisphosphonates and the risk of atypical femur fractures." Bone **156**: 116297.
- Bouxsein, M. L., S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldberg, K. J. Jepsen and R. Müller (2010). "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography." J Bone Miner Res **25**(7): 1468-1486.
- Brown, J. P. (2021). "Long-Term Treatment of Postmenopausal Osteoporosis." Endocrinol Metab (Seoul) **36**(3): 544-552.
- Brown, J. P., J. D. Adachi, E. Schemitsch, J. E. Tarride, V. Brown, A. Bell, M. Reiner, T. Oliveira, P. Motsepe-Ditshego, N. Burke and L. Slatkovská (2021). "Mortality in older adults following a fragility fracture: real-world retrospective matched-cohort study in Ontario." BMC Musculoskelet Disord **22**(1): 105.
- Busse, B., M. Hahn, M. Soltau, J. Zustin, K. Puschel, G. N. Duda and M. Amling (2009). "Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae." Bone **45**(6): 1034-1043.
- Capulli, M., R. Paone and N. Rucci (2014). "Osteoblast and osteocyte: games without frontiers." Arch Biochem Biophys **561**: 3-12.
- Cui, J., Y. Shen and R. Li (2013). "Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain." Trends Mol Med **19**(3): 197-209.

- Dai, Z., Y. Li, L. D. Quarles, T. Song, W. Pan, H. Zhou and Z. Xiao (2007). "Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation." Phytomedicine **14**(12): 806-814.
- de la Lastra, C. A. and I. Villegas (2005). "Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications." Mol Nutr Food Res **49**(5): 405-430.
- Dobbs, M. B., J. Buckwalter and C. Saltzman (1999). "Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist." Iowa Orthop J **19**: 43-52.
- Donmez, B. O., S. Ozdemir, M. Sarikanat, N. Yaras, P. Koc, N. Demir, B. Karayalcin and N. Oguz (2012). "Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs." Pharmacol Rep **64**(4): 878-888.
- Erben, R. G., S. Bromm and M. Stangassinger (1998). "Short-term prophylaxis against estrogen depletion-induced bone loss with calcitriol does not provide long-term beneficial effects on cancellous bone mass or structure in ovariectomized rats." Osteoporos Int **8**(1): 82-91.
- Faibish, D., S. M. Ott and A. L. Boskey (2006). "Mineral changes in osteoporosis: a review." Clin Orthop Relat Res **443**: 28-38.
- Feng, Y. L., X. T. Jiang, F. F. Ma, J. Han and X. L. Tang (2018). "Resveratrol prevents osteoporosis by upregulating FoxO1 transcriptional activity." Int J Mol Med **41**(1): 202-212.
- Florencio-Silva, R., G. R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões and P. S. Cerri (2015). "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells." Biomed Res Int **2015**: 421746.
- Gamsjaeger, S., K. Klaushofer and E. P. Paschalis (2014). "Raman analysis of proteoglycans simultaneously in bone and cartilage." **45**(9): 794-800.
- Glaser, D. L. and F. S. Kaplan (1997). "Osteoporosis. Definition and clinical presentation." Spine (Phila Pa 1976) **22**(24 Suppl): 12S-16S.
- Gökmen, F. (2003). Sistematik Anatomi, İzmir Güven Kitabevi.
- Han, Y., J. Gomez, R. Hua, P. Xiao, W. Gao, J. X. Jiang and X. Wang (2021). "Removal of glycosaminoglycans affects the in situ mechanical behavior of extracellular matrix in bone." J Mech Behav Biomed Mater **123**: 104766.
- He, X., G. Andersson, U. Lindgren and Y. Li (2010). "Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production." Biochem Biophys Res Commun **401**(3): 356-362.
- Helte, E., C. Donat Vargas, M. Kippler, A. Wolk, K. Michaëlsson and A. Åkesson (2021). "Fluoride in Drinking Water, Diet, and Urine in Relation to Bone Mineral Density and Fracture Incidence in Postmenopausal Women." Environ Health Perspect **129**(4): 47005.
- Hsu, J. T., Y. J. Chen, J. T. Ho, H. L. Huang, S. P. Wang, F. C. Cheng, J. Wu and M. T. Tsai (2014). "A comparison of micro-CT and dental CT in assessing cortical bone morphology and trabecular bone microarchitecture." PLoS One **9**(9): e107545.
- Hu, H., M. J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D. M. Ornitz and F. Long (2005). "Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development." Development **132**(1): 49-60.
- İbrahim Deniz AKÇALI, M. G., Kerem ÜN (2009). Kas İskelet Sistemi Biyomekaniği, Çukurova Üniversitesi.
- Jee, W. S. and W. Yao (2001). "Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis." J Musculoskelet Neuronal Interact **1**(3): 193-207.
- Jiang, Y., W. Luo, B. Wang, X. Wang, P. Gong and Y. Xiong (2020). "Resveratrol promotes osteogenesis via activating SIRT1/FoxO1 pathway in osteoporosis mice." Life Sci **246**: 117422.
- Kanis, J. (1997). Osteoporosis. London, Blackwell Healthcare Communications.
- Khosla, S. and L. C. Hofbauer (2017). "Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges." Lancet Diabetes Endocrinol **5**(11): 898-907.
- Klinck, R. J., G. M. Campbell and S. K. Boyd (2008). "Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning." Med Eng Phys **30**(7): 888-895.

- Lasaitė, L. and A. Krasauskienė (2009). "Psychological state, quality of life, and body composition in postmenopausal women with osteoporosis in Lithuania." *Arch Osteoporos* **4**(1-2): 85-90.
- Lee, A. M., T. Shandala, L. Nguyen, B. S. Muhlhausler, K. M. Chen, P. R. Howe and C. J. Xian (2014). "Effects of resveratrol supplementation on bone growth in young rats and microarchitecture and remodeling in ageing rats." *Nutrients* **6**(12): 5871-5887.
- Leiblein, M., D. Henrich, F. Fervers, K. Konradowitz, I. Marzi and C. Seebach (2020). "Do antiosteoporotic drugs improve bone regeneration in vivo?" *Eur J Trauma Emerg Surg* **46**(2): 287-299.
- Li, Y., W. J. Tseng, C. M. J. de Bakker, H. Zhao, R. Chung and X. S. Liu (2021). "Peak trabecular bone microstructure predicts rate of estrogen-deficiency-induced bone loss in rats." *Bone* **145**: 115862.
- Liu, Q., X. Zhang, Y. Jiao, X. Liu, Y. Wang, S. L. Li, W. Zhang, F. M. Chen, Y. Ding, C. Jiang and Z. Jin (2018). "In vitro cell behaviors of bone mesenchymal stem cells derived from normal and postmenopausal osteoporotic rats." *Int J Mol Med* **41**(2): 669-678.
- Liu, X. L., C. L. Li, W. W. Lu, W. X. Cai and L. W. Zheng (2015). "Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture." *Clin Oral Implants Res* **26**(4): 392-398.
- Mandair, G. S. and M. D. Morris (2015). "Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength." *Bonekey Rep* **4**: 620.
- McCreadie, B. R., M. D. Morris, T. C. Chen, D. Sudhaker Rao, W. F. Finney, E. Widjaja and S. A. Goldstein (2006). "Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture." *Bone* **39**(6): 1190-1195.
- Mobasheri, A. and M. J. A. o. t. N. Y. A. o. S. Shakibaei (2013). "Osteogenic effects of resveratrol in vitro: potential for the prevention and treatment of osteoporosis." *1290*(1): 59-66.
- Morgan, E. F., G. U. Unnikrisnan and A. I. Hussein (2018). "Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States." *Annu Rev Biomed Eng* **20**: 119-143.
- Narayanan, A., N. Srinaath, M. Rohini and N. Selvamurugan (2019). "Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation." *Life Sci* **232**: 116676.
- Niwano, Y., H. Kohzaki, M. Shirato, S. Shishido and K. Nakamura (2022). "Anti-Osteoporotic Mechanisms of Polyphenols Elucidated Based on In Vivo Studies Using Ovariectomized Animals." *Antioxidants (Basel)* **11**(2).
- Nordin, M. (2001). *Basic biomechanics of the musculoskeletal system* by Margareta Nordin Victor H. Frankel. Philadelphia, Lippincott Williams and Wililins.
- Nyman, J. S., A. Roy, X. Shen, R. L. Acuna, J. H. Tyler and X. Wang (2006). "The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone." *J Biomech* **39**(5): 931-938.
- Parfitt, A. M., C. H. Mathews, A. R. Villanueva, M. Kleerekoper, B. Frame and D. S. Rao (1983). "Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss." *J Clin Invest* **72**(4): 1396-1409.
- Paschalis, E. P., S. Gamsjaeger, N. Hassler, K. Klaushofer and D. Burr (2017). "Ovarian hormone depletion affects cortical bone quality differently on different skeletal envelopes." *Bone* **95**: 55-64.
- Paschalis, E. P., S. Gamsjaeger and K. Klaushofer (2017). "Vibrational spectroscopic techniques to assess bone quality." *Osteoporos Int* **28**(8): 2275-2291.
- Rezaee, T., M. L. Bouxsein and L. Karim (2020). "Increasing fluoride content deteriorates rat bone mechanical properties." *Bone* **136**: 115369.
- Shah, F. A., A. Stoica, C. Cardemil and A. Palmquist (2018). "Multiscale characterization of cortical bone composition, microstructure, and nanomechanical properties in experimentally induced osteoporosis." *J Biomed Mater Res A* **106**(4): 997-1007.

- Surowiec, R. K., M. R. Allen and J. M. Wallace (2022). "Bone hydration: How we can evaluate it, what can it tell us, and is it an effective therapeutic target?" Bone Rep **16**: 101161.
- Szkudelska, K., M. Deniziak, I. Hertig, T. Wojciechowicz, M. Tyczewska, M. Jaroszevska and T. Szkudelski (2019). "Effects of Resveratrol in Goto-Kakizaki Rat, a Model of Type 2 Diabetes." Nutrients **11**(10).
- Tasci, A., H. Bilgili, H. Altunay, M. R. Gecit and D. Keskin (2010). "Biomechanical and histological outcome of combined raloxifene-estrogen therapy on skeletal and reproductive tissues." Eur J Pharmacol **627**(1-3): 354-361.
- Taylor, E. A. and E. Donnelly (2020). "Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties." Bone **139**: 115490.
- Turner, C. H. (2002). "Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality." Osteoporos Int **13**(2): 97-104.
- Turner, C. H. (2006). "Bone strength: current concepts." Ann N Y Acad Sci **1068**: 429-446.
- Turner, C. H. and D. B. Burr (1993). "Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial." Bone **14**(4): 595-608.
- Unal, M. (2021). "Raman spectroscopic determination of bone matrix quantity and quality augments prediction of human cortical bone mechanical properties." J Biomech **119**: 110342.
- Unal, M., R. Ahmed, A. Mahadevan-Jansen and J. S. Nyman (2021). "Compositional assessment of bone by Raman spectroscopy." Analyst **146**(24): 7464-7490.
- Unal, M., A. Creecy and J. S. Nyman (2018). "The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone." Curr Osteoporos Rep **16**(3): 205-215.
- Unal, M., H. Jung and O. Akkus (2016). "Novel Raman Spectroscopic Biomarkers Indicate That Postyield Damage Denatures Bone's Collagen." J Bone Miner Res **31**(5): 1015-1025.
- Wang, W., L. M. Zhang, C. Guo and J. F. Han (2020). "Resveratrol promotes osteoblastic differentiation in a rat model of postmenopausal osteoporosis by regulating autophagy." Nutr Metab (Lond) **17**: 29.
- Williams, S. A., S. G. Daigle, R. Weiss, Y. Wang, T. Arora and J. R. Curtis (2021). "Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the US Medicare Population." Ann Pharmacother **55**(7): 821-829.
- Wu, J., X. H. Cai, X. X. Qin and Y. X. Liu (2018). "The effects of sclerostin antibody plus parathyroid hormone (1-34) on bone formation in ovariectomized rats." Z Gerontol Geriatr **51**(5): 550-556.
- Yang, X., T. Jiang, Y. Wang and L. Guo (2019). "The Role and Mechanism of SIRT1 in Resveratrol-regulated Osteoblast Autophagy in Osteoporosis Rats." Sci Rep **9**(1): 18424.
- Yousefzadeh, N., K. Kashfi, S. Jeddi and A. Ghasemi (2020). "Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide." Excli j **19**: 89-107.
- Zhao, H., X. Li, N. Li, T. Liu, J. Liu, Z. Li, H. Xiao and J. Li (2014). "Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus." Br J Nutr **111**(5): 836-846.

## 9. EKLER

### Ek 1- Etik Kurul Kararı



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı :60758568-020/48556  
Konu :Başvurunuz hk.

18/08/2020

Sayın Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ

İlgi :27.07.2020 tarihli dilekçeniz

"Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Osteoporoz Modelinde Resveratrol'ün Kemik Doku Üzerindeki Biyomekanik Ve Moleküler Etkilerinin Gösterilmesi" konulu ( PAUHDEK 2020-22) no'lu çalışmanız 13.08.2020 tarih ve 2020/04 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasının **Hayvan deneyleri etiği** açısından uygun olduğuna ve 60 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Prof. Dr. Gülçin MEHİR  
Başkan