

PROBİYOTİK SUPERNATANTININ KÖK HÜCRENİN OSTEOBLAST FARKLANMASINA KATKISI

Müge KARAKAYALI^{1*}, İbrahim TUĞLU²

¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bölüm / İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türkiye muge.karakayali@idu.edu.tr,
Orcid1:0000-0001-5779-4102

²Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Bölüm / Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türkiye mituglu@yahoo.com, Orcid2
0000-0002-0569-8415

*(muge.karakayali@idu.edu.tr) Başlıca yazarın mail adresi

Özet – Probiyotikler sağlıkta destek ve tedavi amaçlı kullanılan yararlı bakterilerdir. Mezenkimal Kök Hücre özellikle ortopedik hastalıklar olmak üzere kliniğin her alanında metaanalizler ile gösterilen etkinlikleri olan ürünlerdir. Barsak mikrobiyotası ile kemik etkileşmesine paralel olarak probiyotiklerin osteoblast üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Bu çalışmada süpernatant ile elde edilen probiyotik metabolitlerinin kök hücrenin osteoblasta farklanmasına etkisi incelendi. Erişkin sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak semikonfluent aşamada osteojenik besiyerinde osteoblastik farklanmaya yönlendirildi. Probiyotik süpernatantı besiyerine eklenerek farklanmaya etkisi adacık oluşumu, ALP/Von Kossa ve Alizarin kırmızısı histokimyası ile osteonektin immunohistokimyası kullanılarak değerlendirildi. Süpernatantın çoğalmayı ve farklanmayı anlamlı bir şekilde arttırdığı saptandı. Probiyotik metabolitlerinin osteoblastik farklanmaya olan bu anlamlı katkılarının in vivo deneyler ile doğrulanmasının yararlı olacağı anlaşıldı. Alınacak sonuçların, kemik patolojilerinde koruyucu ve önleyici tedavi etkinliğini artırarak hasta yaşam kalitesini yükselteceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler – Probiyotik Süpernatant, Mezenkimal Kök Hücre, Osteoblast, Farklanma, Belirteç

I. GİRİŞ

Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH) için osteoblastik farklılaşma tıpta son zamanlarda gittikçe artan bir şekilde ilgi çekmektedir. Bu farklılaşmanın amacı, daha iyi osteoblastik rejenerasyonun sağlanmasıdır. Yara iyileşmesi ve fonksiyonu mükemmelleşir. Kemiği hedefleyen Kök hücre bazlı tedavi ve Rejenerasyon uzun zamandır bilinmekte ve klinikte kullanılmaktadır. Doku mühendisliğinin katkıları ile daha da mükemmelleşen bu tedavilerde rejenerasyonun artması, immünmodülasyonun geliştirilmesi ve daha iyi kemik yapımının sağlanması gerçekleştirilmektedir [1]- [3].

Probiyotikler (PB) bu rejenerasyona katkı sağlayabilecek ürünlerdir. Kemik metabolizması, genetik, beslenme, besleme yönetimi, çevresel veya

diğer etkileyen faktörler tarafından kontrol edilen karmaşık bir düzenleyici süreçtir. Mikrobiyota, büyük mikro ekosistemi oluşturur ve birçok metabolik olayla yakından ilişkilidir. Besinlerin emilimini ve bariyer işlevini etkileyerek kemik hastalığı dahil olmak üzere birçok bozukluklarda gastrointestinal sistemin, bağışıklık sisteminin ve hatta bağırsak-kemik ekseninin düzenlenmesini sağlar. Son zamanlarda, probiyotik bazlı diyet takviyesi, iyileştirmek için ortaya çıkan bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Bağırsak-kemik eksenine dayalı olarak kemik metabolizmasını düzenleyerek kemik sağlığı ve rejenerasyonunda etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu ürünlerin klinikte yararlı olduklarına işaret etmektedir [4]- [6].

Kültür süpernatantlarının anti-patojenik potansiyeli az miktarda çalışmada gösterilmiştir.

Kültür süpernatantlarının virülans azaltıcı etkisi, süpernatantla tedavi edilen ana patojenlerin alt popülasyonlarına da iletildi. Laktik asit, kültür süpernatantlarının anti-virülans aktivitesini önemli ölçüde belirlemesine rağmen asidik pH tan bağımsız olarak etki ediyor görünmektedir. Bu süpernatantların karakterizasyonu ve biyoaktif bileşenlerin tanımlanması için daha fazla araştırma yapılarak etki mekanizmalarının ortaya konması gerekmektedir. Bu süpernatantların anti-patojenik potansiyeli ile ilişkili moleküler temelin aydınlatılması, patojenik bakteri popülasyonları için yeni hedeflerin tanımlanmasına yol açabilir [7]-[10].

Bu çalışmada, PB süpernatantının MKH osteojenik farklanmasına etkisi ve katkısı incelendi.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

Wistar Albino sıçanlardan steril koşullarda alınan dorsal kütanöz yağ dokusu alfa-MEM mediumu içerisinde mekanik ayrıştırma yöntemi ile küçük parçalara ayrıştırıldı. Eksplant kültür yöntemi ile çoğalan hücreler besiyeri ile yıkanarak çoğalmaya bırakıldı. Kontrol gurubunda herhangi bir faktör eklenmedi ve deney gurubunda besiyerine eklenen faktörlerle osteoblastik farklılaşma oluşturuldu. Osteonektin ile immünohistokimyasal olarak işaretlenip h-skor ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Probiotic gold preparatı içerisindeki 2.5×10^9 *Enterococcus faecium*, 2.5×10^9 *Lactobacillus acidophilus*, 2.5×10^9 *Lactobacillus rhamnosus*, 2.5×10^9 *Bifidobacterium longum*, 2.5×10^9 *Bifidobacterium bifidum* bakterileri kullanıldı.

Probiyotiklerin bakteri hücresi içermeyen süpernatantını hazırlamak için, yukarıda belirtilen kaynaklardan 5 suş, anaerobik koşullar altında 37 °C'de 18-24 saat Man- Rogosa-and Sharpe (MRS) (Difco) sıvı besiyerinde kültüre edildi. Bakteri içermeyen süpernatant (BİS, bacteria-free supernatants), 20 dakika 3000 rpm'de santrifüjleme ile elde edildi. BİS'nin hücresiz durumunu sağlamak için süpernatantlar, 0.4 µm gözenek boyutlu bir filtreden geçirildi [11,12].

MTT Assay Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid] assay yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi

ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer yasayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir. Steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlandı ve 96 kuyucuklu plaklara ilave edildi. İnkübatörde 3 saat bekletildikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında (Bio-Rad, ABD) 540 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol kuyucukları okutulmuş elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Çözücü ve ajan uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi [12,13].

MKH osteoblastik farklanma için vitro osteojenik indüksiyon uygulandı. Hücreler $2,5 \times 10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde yerleştirildikten sonra semikonfluent aşamaya getirildi. Bu aşamada hücreler 50 mg/mL askorbik asit, 100 nM deksametazon ve 10 mM β-gliserofosfat eklenmiş besiyerinde bekletildi. Aynı anda probiyotik eklendi [13]

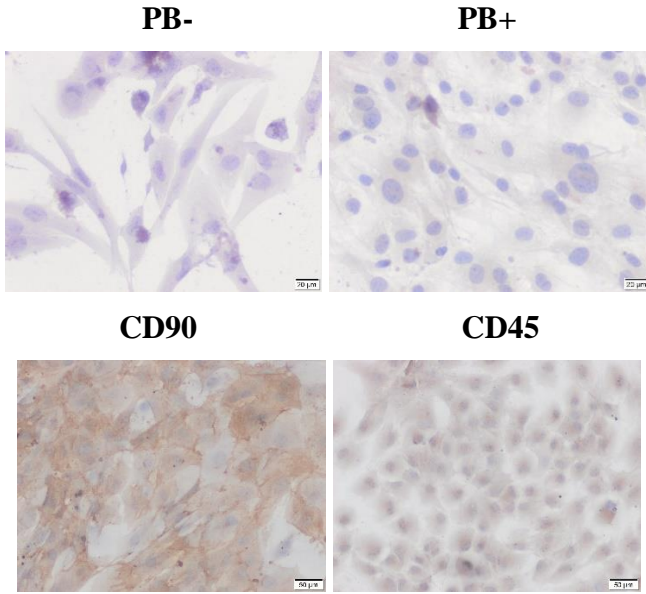
Hücre tabakasının mineralizasyonu, Alizarin kırmızısı S veya von Kossa boyaması kullanılarak incelendi. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı, %10 formalin solüsyonu ile 30 dakika sabitlendi ve daha sonra iki kez saf su ile yıkandı. Alizarin red S boyaması için hücreler %2 Alizarin red S (pH 4.1; Sigma) solüsyonunda 10 dakika bekletildi, 3 kez saf su ile yıkandı ve sonra havayla kurutuldu. Von Kossa boyaması için hücre katmanları, UV ışığı altında 10 dakika süreyle %5 gümüş nitrat (Sigma) çözeltisine yerleştirildi ve 5 dakika süreyle %2.5 sodyum tiyosülfata daldırıldı. Saf su ile yıkandıktan sonra, hücre katmanları fotoğraflandı

İmmünohistokimyasal analiz için osteoblasta farkedirilmiş MKH %4 (v/v) tamponlu paraformaldehit ile sabitlendi. Endojen peroksidaz aktivitesinin metanol içinde %3 (h/h) hidrojen peroksit ile 30 dakika süreyle inhibisyonundan sonra, kesitler PBS ile yıkandı ve spesifik olmayan bağlanma, %1 (a/h) sığır serum albümini ve %1,5 normal keçi serumu ile 30 dakika oda sıcaklığında inhibe edildi. (a/h). Slaytlar daha sonra bir gece

boyunca 4 °C'de osteonektin (Santa Cruz, ABD) karşı keçi poliklonal antikoru ile inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra örnekler, sekonder biyotinlenmiş antikorlar ve HRP-konjuge streptavidin ile inkübe edildi. Boyama, kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB) ile yapıldı ve Mayer'in hematoksileninde karşı boyama yapıldı. Damıtılmış su ile durulandıktan sonra, slaytlar bir etanol serisi ile kurutuldu, ksilen içinde temizlendi ve mikroskopi için sliplerle kaplandı. Mikroskopla fotoğraflanıp bilgisayar ortamına aktarıldı [9,10]

III. BULGULAR

MKH kontrol grubunda hızla çoğalarak konfluent oldu. MKH karakterizasyonu CD90 pozitifliği ve CD45 negatifliği ile gösterildi. (Resim 1, Tablo 1).



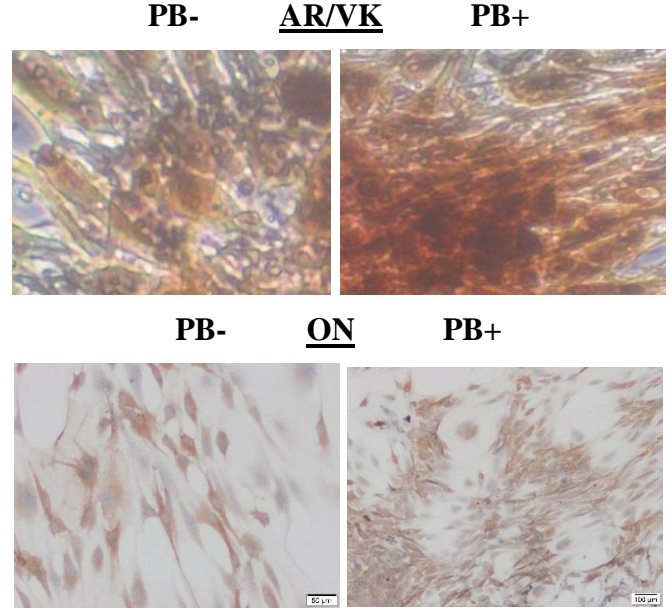
Şekil 1. MKH faz kontrast ve karakterizasyonu için CD90 + CD45- belirteç görüntüleri

Tablo 1. MTT ve H-skor

PB-	PB+
MTT (p<0,001)	
786,45±125,88	1125,44±155,22
H-skor CD90 (p<0,001)	
186,34±24,66	236,78±27,12
H-skor CD45 (p<0,001)	
9,34±5,64	6,32±2,56

Farklılaşan MKH adacıklar şeklinde büyüüp ortasından çevresine yayılan farklılaşma gösterdi. ALP/Von Kossa ve Alizerin Kırmızısı boyamalarda histolojik olarak oluşan kemik adacıkları izlendi. Adacık merkezinden başlayan ve periferine doğru azalan osteonektin ile gösterilen osteoblasta farklılaşması arasında benzerlik olduğu görüldü. PB süpernatant eklenen

kültürlerde kontrolde çoğalmanın ve osteojenik farklılaşmadaki hücrelerde farklılaşmanın anlamlı bir şekilde arttığı saptandı (resim 2, Tablo 2).



Şekil 2. AK/VK faz kontrast ve ON belirteç görüntüleri

Tablo 2. AK/VK ve ON boyamaları

PB-	PB+
AK/VK (p<0,001)	
2,45±0,58	3,82±0,64
ON (p<0,001)	
186,34±24,66	236,78±27,12

IV TARTIŞMA

MKH, osteojenik farklılaşma yetenekleri nedeni ile doku mühendisliğinde ve umut verici bir terapötik ajan olarak önemlidir. Probiyotikler barsak kemik etkileşimi üzerinden etkili olabilen ve tedavide yer almaya başlayan önemli ürünlerdir. Bu çalışmada MKH osteojenik farklılaşmasında PB etkisi histokimyasal ve immuohistokimyasal olarak çalışıldı. PB süpernatant destekli kültürdeki MKH osteojenik farklılaşmasının anlamlı bir şekilde daha iyi olduğu VonKossa ve Alizarin kırmızısı ile histokimyasal ve osteonektin ile immunohistokimyasal olarak gösterildi. VonKossa ve Alizarin kırmızısı ile MKH osteojenik farklılaşmasında kalsiyum birikimi ve kültürdeki adacık oluşumunda mineralizasyon düzeyini göstermektedir. Osteonektin ile osteoblasta farklılaşmanın düzeyi ortaya konmaktadır. Bu sonuçlar ile PB metabolit katkısının anlamlı bir şekilde daha yüksek bir osteojenik potansiyel oluşturduğu saptandı.

Önceki çalışmalarda PB kullanımının osteojenik farklılaşmada ve kemik yara iyileşmesinde anlamlı katkısı gösterilmiştir [7,8].

Bu çalışmada amaçlanan PB metabolitlerini süpernatant olarak kullanarak daha iyi farklanma ve fonksiyon sağlayan osteoblast oluşturabilme olasılığıdır.

Probiyotikler, osteoporozun neden olduğu sistematik kemik kaybını önleyebilir ve azaltabilir. Önceki çalışmalarda mandibular kemik kaybını azaltmadaki etkinliklerini gösterilmiştir. Bir başka çalışmada topikal olarak uygulanan *Lactobacillus brevis*'in deneysel periodontal inflamasyonu ve alveolar kemik kaybını inhibe ettiğini bildirmiştir. Diğer bir çalışmada topikal *Saccharomyces cerevisiae* uygulaması ve mekanik tedavi kombinasyonunun periodontitiste alveolar kemik kaybını azalttığını göstermiştir [7,12]. Çalışmamızda da alınan PB süpernatantı ile daha iyi bir osteoblastik farklanmanın sağlanması bu çalışmalar ile uyumlu ve *in vivo* çalışma yapılmasını gerektiren bir duruma işaret etmektedir.

Sonuçlarımız, MKH osteogenezinin ve proliferasyonunun PB ile arttığını göstermektedir. Benzer bir çalışmada LGG kültürü süpernatantının MKH için osteojenik ve proliferatif kapasitesinin arttığını göstermiştir. Süpernatanttan salgılanan faktörler tanımlanması ve daha fazla çalışma ile mekanizmalarının ortaya konması gerekmektedir [10].

Yapılmış çalışmalarda birçok farklı faktörün MKH farklanmasında mineralizasyonu arttırdığına işaret etmektedir. Çalışmamız benzer şekilde MKH osteoblastik farklanmasında PB kullanımının kalsiyum birikim miktarının arttırdığını göstermiştir. Önceki çalışmalarda birçok faktör üzerinden RUNX-2, Osteonektin, Osteokalsin, kollajen ve alkalın fosfataz gibi kemikleşme belirteçlerinin ifadelerinde artış izlenmiştir [6]. Bizim çalışmamızda da PB süpernatant kullanılarak metabolitlerin Osteonektin düzeyini arttığını saptadık.

PB süpernatantını tarafından artırılan osteojenik farklılaşmanın olası mekanizması ile ilgili birçok mekanizma geçerli olabilir. Hücrelerin mekanik, fizikokimyasal ve biyolojik ortamlarını yönetmek, çoğalma, göç ve farklılaşma gibi hücrel aktivitelere iyileştirmek gibi etkileri

incelenmelidir. Osteojenik farklılaşma ortamı, Askorbik asit, Deksmetazon ve β -gliserofosfat içerir. Osteojenik farklılaşma ortamı bileşenleri ve büyüme faktörleri, hücrel farklılaşma tepkilerini indükleyebilir. Bu şekilde hücre yayılması, morfolojisi ve farklılaşmasında rol oynayabilir.

Kültür süpernatantlarının anti-patojenik potansiyelini az miktarda çalışmada gösterilmiştir. Kültür süpernatantlarının virülans azaltıcı etkisi, süpernatantla tedavi edilen ana patojenlerin yavru popülasyonlarına da iletildi. Laktik asit, kültür süpernatantlarının anti-virülans aktivitesini önemli ölçüde belirlemesine rağmen asidik pH tan bağımsız olarak etki ediyor görülmektedir. Bu süpernatantların karakterizasyonu ve biyoaktif bileşenlerin tanımlanması için daha fazla araştırma yapılarak etki mekanizmalarının ortaya konması gerekmektedir. Bu süpernatantların anti-patojenik potansiyeli ile ilişkili moleküler temelin aydınlatılması, patojenik bakteri popülasyonları için yeni hedeflerin tanımlanmasına yol açabilir [8,9,13].

IV. SONUÇLAR

Hücrel tedaviye PB katkısı ile daha iyi bir tedavinin ve hasta yaşam kalitesinin sağlanacağı düşünüldü.

KAYNAKLAR

- [1] Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold P. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J.* 2013 Sep 23.
- [2] Patel AN, Genovese J. Potential clinical applications of adult human mesenchymal stem cell (Prochymal®) therapy. *Stem Cells Cloning.* 17;4:61-72. Nov 2011
- [3] Deliloglu-Gurhan SI, Vatansever HS, Ozdal-Kurt F, Tuglu I. Characterization of osteoblasts derived from bone marrow stromal cells in a modified cell culture system. *Acta Histochem.*;108(1):49-57 2006
- [4] Khorsand A, Eslaminejad MB, Arabsolghar M, Paknejad M, Ghaedi B, Rokn AR, Moslemi N, Nazarian H, Jahangir S. Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. *J Oral Implantol.*;39(4):433-43. Aug 2013
- [5] Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am;* 56(3):549-61, Jul. 2012
- [6] Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, Karaoz E. Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*;102(1):119-30, Jan 2014

- [7] Patel P, Joshi C, Kothari V. Supernatants of the Probiotic Bacterial Cultures at sub-MIC Levels Attenuate Virulence of Pathogenic Bacteria Towards the Model Host *Caenorhabditis elegans*. *Infect Disord Drug Targets*.;20(6):867-877, 2020.
- [8] Chen P, Xu T, Zhang C, Tong X, Shaikat A, He Y, Liu K, Huang S. Effects of Probiotics and Gut Microbiota on Bone Metabolism in Chickens: A Review. *Metabolites*. 20;12(10):1000, Oct. 2022
- [9] Shen C, Yang C, Xu S, Zhao H. Comparison of osteogenic differentiation capacity in mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane (AM), umbilical cord (UC), chorionic membrane (CM), and decidua (DC). *Cell Biosci*. 11;9:17 Feb 2019.
- [10] Liu H, Gu R, Li W, Xue J, Cong Z, Wei Q, Zhou Y. Probiotics protect against tenofovir-induced mandibular bone loss in mice by rescuing mandible-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *J Oral Rehabil*.;47 Suppl 1:83-90, Nov 2020
- [11] Karakayalı M., Önal T., Sönmez Tamer Z. G., Tuğlu, M. İ. (2022). "Probiyotiklerin Kültürde Mezenkimal Kök Hücre Davranışına Etkisi". *Balıkesir Medical Journal* 6 :7-16.
- [12] Khodaii Z, Ghaderian SMH, Natanzi MM. (2017). Probiotic Bacteria and their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines from Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Invasion. *Int J Mol Cell Med*. Epub.6(3):183-189.
- [13] R.P. Ross, S. Mills, C. Hill, G.F. Fitzgerald, C. (2010). Stanton, Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function, *International Dairy Journal* 20, (4),269-276.