



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**RAT KALVARYUMU KRİTİK BOYUTLU DEFEKT  
MODELİNDE KÖPEK VE KEDİ MİKROBİYOTA KAYNAKLI  
POSTBİYOTİKLERİN KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**Ali Furkan ERDOĞAN**

**CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ŞEN**

**ANKARA**

**2024**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RAT KALVARYUMU KRİTİK BOYUTLU DEFEKT  
MODELİNDE KÖPEK VE KEDİ MİKROBİYOTA KAYNAKLI  
POSTBİYOTİKLERİN KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE  
ETKİSİ

Ali Furkan ERDOĞAN  
CERRAHİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ŞEN

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Fadime KIRAN

ANKARA

2024

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Rat Kalvaryumu Kritik Boyutlu Defekt Modelinde Köpek ve Kedi Mikrobiyota Kaynaklı Postbiyotiklerin Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ali Furkan ERDOĞAN

Tarih: 17/07/2024

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Cerrahi Anabilim Dalında

Ali Furkan ERDOĞAN tarafından hazırlanan

“Rat Kalvaryumu Kritik Boyutlu Defekt Modelinde Köpek ve Kedi Mikrobiyota Kaynaklı Postbiyotiklerin Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/07/2024

İmza

Prof. Dr. Zeynep PEKCAN

Kırıkkale Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Barış KÜRÜM

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

İmza

Doç. Dr. Murat ÇALIŞKAN

Ankara Üniversitesi

Raportör

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ŞEN

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **Rat Kalvaryumu Kritik Boyutlu Defekt Modelinde Köpek ve Kedi Mikrobiyota Kaynaklı Postbiyotiklerin Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisi**

Klinik sorunları çözmek amacıyla biyolojik kaynak sağlamayı amaçlayan kemik doku mühendisliği, son yıllarda ilerleme kaydederek kemik dokusu onarımı için umut verici ürünlerin geliştirilmesine imkan sağlamaktadır. Bu alanda gerçekleştirilen güncel gelişmeler ise, bağırsak mikrobiyotasının kemik döngüsünde kritik bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Mikrobiyota-kemik eksenini çerçevesinde meydana gelen iletişimden ise postbiyotik adı verilen ve mikrobiyota üyeleri tarafından üretilen metabolitlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Gerçekleştirilen tez çalışmasının temel amacı, kedi (tekir) fekal mikrobiyotası kaynaklı *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 ve köpek (kangal) süt mikrobiyotası kaynaklı *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşlarına ait postbiyotiklerin veteriner hekimlikte karşılaşılan kemik dejenerasyonuna yönelik potansiyel etkilerini ticari bir yapı iskelesine entegrasyonları neticesinde *in vivo* koşullar altında değerlendirmektir. Postbiyotiklerin yapı iskelesine entegre edilecek dozu hücre kültürü çalışmaları neticesinde belirlenmiştir. Bu amaçla, fare preosteoblast hücreleri kullanılmış ve toksisite göstermeyen en yüksek doz olan 100 µg/ml ilerleyen çalışmalara dahil edilmiştir. *In vivo* çalışma kapsamında rat kalvaryumu kritik boyutlu defekt modeli kullanılmıştır. Kemik ve kalvaryum hasarının olduğu bölgeye implante edilen postbiyotik içeren yapı iskelelerinin etkinliği postbiyotik içermeyen yapı iskelelerine ve kontrol grubuna karşı planar radyografi, bilgisayarlı tomografi ve histopatolojik incelemeler açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde, tam bir kemik oluşumu sağlanmamış olsa da postbiyotiklerin travma bölgesinde meydana getirilen hasarın onarılmasında önemli bir rol oynadığı ve iyileşme sürecini hızlandırdığı tespit edilmiştir. Özellikle, fibröz doku miktarının ciddi oranda hızlanması ve artması, yangı ve vaskülarizasyon miktarının postbiyotik içeren gruplarda yüksek derecede anlamlı fark yaratması yeterli süre bekleme sağlandığı takdirde kemik oluşum sürecini de hızlandırabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Kemik Doku Mühendisliği, Mikrobiyota, Postbiyotik, Rejenerasyon

## SUMMARY

### **Effect of Dog and Cat Microbiota-Derived Postbiotics on Bone Regeneration in Rat Calvarium Critical Size Defect Model**

Bone tissue engineering, aiming to provide biological sources to solve clinical problems, has made progress in recent years and has enabled the development of promising products for bone tissue repair. Current developments in this field have revealed that the gut microbiota is a critical factor in bone turnover. The communication that occurs within the microbiota-bone axis is thought to be mediated by postbiotics, metabolites produced by members of the microbiota. The main objective of this thesis is to evaluate the potential effects of postbiotics-derived *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 isolated from cat (Tekir) fecal microbiota and *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 isolated from dog (Kangal) milk microbiota, in the treatment of bone degeneration encountered in veterinary medicine under *in vivo* conditions by integrating them into a commercial scaffold structure. The dose of postbiotics to be integrated into the scaffold structure was determined by cell culture studies. For this purpose, rat preosteoblast cells were used and the highest non-toxic dose of 100 µg/ml was included in further studies. A rat calvarium critical size defect model was used in the *in vivo* study. The effectiveness of postbiotic-containing scaffolds implanted in the area of bone and calvarium damage was evaluated against postbiotic-free scaffolds and the control group using planar radiography, computed tomography, and histopathological examinations. The results showed that although complete bone formation was not achieved, postbiotics played an important role in repairing the damage in the trauma area and accelerated the healing process. In particular, the significant acceleration and increase in the amount of fibrous tissue, and the highly significant differences in the amount of inflammation and vascularization in the postbiotic-containing groups, suggest that postbiotics may also accelerate the bone formation process if sufficient waiting time is provided.

**Keywords:** Bone Tissue Engineering, Microbiota, Postbiotic, Regeneration

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Kemik Dokusu	2
1.1.1.Kemik Yapısı Ve Morfolojisi	2
1.1.2. Kemik Hücreleri	3
1.1.3. Kemik Oluşum Süreci	6
1.1.4. Kemik Yeniden Yapılanması	8
1.1.5. Kırık İyileşmesi	8
1.2. Kemik Doku Mühendisliği	9
1.2.1. Biyomalzemeler	12
1.2.2. Hücreler	14
1.2.3. Biyoaktif Faktörler	14
1.3. Mikrobiyota-Kemik Ekseni	15
1.4. Biyotikler	17
1.5. Postbiyotikler	18
1.5.1. Ekzopolisakkaritler	20
1.5.2. Enzimler	21
1.5.3. Hücre Duvarı Fragmentleri	21
1.5.4. Kısa Zincirli Yağ Asitleri	22
1.5.5. Diğer Metabolitler	22
1.6. Postbiyotiklerin Genel Etki Mekanizmaları	23
1.7. Kemik Sağlığı Ve Hastalıklarında Postbiyotiklerin Rolü	26
1.7.1. Postbiyotikler İle Mineral Emilimi Arasındaki İlişki	26
1.7.2. Postbiyotikler ile Osteojenik Farklılaşma, Kondrogenez, Kemik Oluşumu ve Emilimi Arasındaki İlişki	28
1.7.3. Postbiyotikler ile Kemik Metabolizması Arasındaki İlişki	30
1.7.4. Postbiyotikler ile Kemik İyileşmesi Arasındaki İlişki	31
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>33</b>
2.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Bakteriler	33
2.2. Postbiyotiklerin Eldesi	33
2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
2.4. <i>İn vivo</i> Çalışmalar	35
2.4.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Deney Hayvanları ve Bakımı	35
2.4.2. Deneysel Hayvan Grupları ve Uygulamalar	35
2.4.3. Histopatolojik Analizler	36
2.4.4. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Analizleri	37
2.4.5. Planar Radyografi Analizleri	37
2.5. İstatistiksel Analizler	37

<b>3. BULGULAR</b>	38
3.1. Postbiyotik Dozunun Seçimi	38
3.2. Postbiyotiklerin Rat Kalvaryumu Kritik Boyutlu Defekt Modelinde Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisi	38
3.2.1. Histopatolojik Bulgular	38
3.2.2. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Bulguları	44
3.2.3. Planar Radyografi Bulguları	54
<b>4. TARTIŞMA</b>	61
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	66
<b>KAYNAKLAR</b>	69
<b>EKLER</b>	87
Ek-1 Etik Kurul Onay Belgesi	87



## ÖNSÖZ

Tez çalışmamı hazırlamamda emeği olan;

Hem lisans eğitimim hem de lisansüstü doktora eğitimim boyunca benden bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, sorularıma her daim cevap alabildiğim danışman hocam ve abim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ŞEN'e,

Akademi konusunda çok şey öğrendiğim, her sorunumda ve bilgiye ihtiyacım olduğu anda yanımda olup desteklerini esirgemeyen, daimî olarak iletişimde kalabildiğim çok kıymetli ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fadime KIRAN'a,

Eski danışmanım Sayın Em. Prof. Dr. Ömer BEŞALTI'ya,

Tez izleme komitemde yer alan kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI'ya ve Doç Dr. Murat ÇALIŞKAN'a,

Doktora eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim Dr. Öğr. Üyesi Pınar CAN'a,

Deneysel çalışmalarını gerçekleştirmemde yardımcı olan Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) ekibine,

Gece gündüz demeden hep beraber bu zorlu yolu yürüdüğümüz kıymetli meslektaşlarım ve arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Eren USLU, Vet. Hekim Selahattin Halil ERGİN, Vet. Hekim Dr. İlayda PAZARBAŞILAR ve Vet. Hekim Dilara ACETLER'e

Eğitim hayatıma atıldığım ilk günden bugüne kadar desteklerini koşulsuz ve şartsız olarak hissettiğim ve lisansüstü eğitimimi de sağlıklı şekilde tamamlayabilmem için ellerinden geleni ardına koymayan çok sevdiğim babam Ramazan ERDOĞAN'a ve annem Mine ERDOĞAN'a,

Yoğun çalışma tempom esnasında yardımlarını hiç esirgemeyip benim için uğraşan ve ellerinden geleni yapan çok sevdiğim kardeşlerim Dilara ERDOĞAN'a ve Sıla ERDOĞAN'a,

Hayatıma girdiği günden beri hep daha iyi olmam için beni destekleyen ve benimle daima gurur duyan, kendi ideali olan veteriner göz hastalıkları için de canla başla çalışıp emek veren ruh eşim Vet. Hekim İrem YILMAZ'a,

Kardeşim gibi sevdiğim ve çok kıymetli bir veteriner iç hastalıkları hekimi olacağına inandığım Vet. Hekim Eren YILMAZ'a

Lise sıralarından bugüne kadar hep beraber olduğumuz, iyi veya kötü her durumu beraber karşıladığımız çok sevdiğim arkadaşlarım Ege BAYAZIT'a ve Araş. Gör. Uzman Biyolog Seyfullah BEKDEMİR'e,

Üzerimde emeği bulunan tüm arkadaşlarım ve meslektaşlarıma,

100/2000 Doktora Bursiyeri olduğum YÜKSEKÖĞRETİM KURULU BAŞKANLIĞI'na her daim destekleri için teşekkür ederim.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

AAA	Aromatik Aminoasitler
BF	Büyüme Faktörü
CSF-1	Koloni Uyarıcı Faktör 1
DMSO	Dimetil sülfoksit
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid 1
HDAC	Histon Deasetilaz
HDM	Hücre Dışı Matriks
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HePS	Heteropolisakkaritler
HoPS	Homopolisakkaritler
IFN	İnterferon
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL	İnterlökin
KZYA	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MKPM	Mikrobiyota Kaynaklı Postbiyotik Mediatörler
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromid
NF- $\kappa$ B	Nükleer Faktör Kappa B
NO	Nitrik Oksit
OPG	Osteoprotegerin
PEEK	Polietereter Keton
PGA	Poliglikolik Asit
PMMA	Polimetilmetakrilat
PPAR $\alpha$	Peroksizom Proliferatörüyle Etkinleştirilen Reseptör Alfa
ROS	Reaktif Oksijen
RUNX2	Runt ile İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2
TGF- $\beta$	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF- $\alpha$	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
UA	Ürolitin A
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

## ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Trabeküler ve kortikal morfoloji ve kemik hücreleri	3
Şekil 1. 2. Kemik dokusu mühendisliği paradigması	11
Şekil 1. 3. Postbiyotikler olarak sınıflandırılan metabolitlerin şematik gösterimi	19
Şekil 1. 4. Postbiyotiklerin genel etki mekanizmaları	24
Şekil 2. 1. Postbiyotik eldesinin temel aşamaları	34
Şekil 3. 1. Postbiyotiklerin fare preosteoblast hücre canlılığı üzerindeki etkileri	39
Şekil 3. 2. Grupların canlı ağırlık dağılımına ait grafik	40
Şekil 3. 3. Kalvaryum örneklerinin genel kesit görüntüleri	41
Şekil 3. 4. Kalvaryum örneklerinin histopatolojik analizleri H&E boyaması	41
Şekil 3. 5. Sadece defekt oluşturulan kontrol grubuna ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri	45
Şekil 3. 6. Defekt oluşturulan ve yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş gruba ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri	46
Şekil 3. 7. Defekt oluşturulan ve Enterococcus faecium EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri	47
Şekil 3. 8. Defekt oluşturulan ve Enterococcus lactis EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri	48
Şekil 3. 9. Kemik mineral yoğunluğu ve kemik mineral içeriği ölçümleri için gruplarda yer alan rat kalvaryumlarının taranan alan miktarı (cm <sup>2</sup> )	49
Şekil 3. 10. Rat kalvaryumları toplam kemik mineral içeriklerinin karşılaştırılması	50
Şekil 3. 11. Rat kalvaryumları toplam kemik mineral yoğunluklarının karşılaştırılması	51
Şekil 3. 12. Rat kalvaryumları toplam kemik hacmi miktarlarının karşılaştırılması	52
Şekil 3. 13. Rat kalvaryumunda oluşturulan defekt alanlarının gruplar arasındaki karşılaştırması	53
Şekil 3. 14. Toplam kemik hacminin defekt alanına oranının gruplar arasındaki karşılaştırması	54
Şekil 3. 15. Sadece defekt oluşturulan kontrol grubuna ait planar radyografi görüntüsü	55
Şekil 3. 16. Defekt oluşturulan ve yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş gruba ait planar radyografi görüntüsü	56
Şekil 3. 17. Defekt oluşturulan ve Enterococcus faecium EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait planar radyografi görüntüsü	57
Şekil 3. 18. Defekt oluşturulan ve Enterococcus lactis EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait planar radyografi görüntüsü	58
Şekil 3. 19. Kemik Köprüleri ve Birleşme Derecesi Puanlama Kılavuzu kullanılarak elde edilen skorların gruplar arasındaki karşılaştırması	60

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 3. 1.</b> Gruplarda yer alan hayvanların genel ağırlıkları (gr)	40
<b>Çizelge 3. 2.</b> Kemik Köprüleri ve Birleşme Derecesi İçin Puanlama Kılavuzuna göre planar radyografi üzerinden numunelerin skor değerleri	59



# 1. GİRİŞ

Kemik, işlevselliği korumak için her zaman modellenerek ve yeniden şekillenerek kendi kendini inşa edebilen dinamik bir dokudur. Kemik dokusu, yumuşak dokulara ve vücuda yapısal destek sağlamak, yetişkinlerde hematopoezin merkezi bölgesi olmak ve mineral homeostaziye katkıda bulunmak gibi vücutta birçok hayati fonksiyondan sorumludur. Ayrıca, hasar gördüğünde otomatik olarak yenilenme gibi doğuştan gelen bir yeteneğe sahiptir. Bu süreçlerin tümü biyokimyasal ve mekanik uyarılarla ilgili çeşitli moleküler mekanizmalara bağlıdır. Ancak lezyonun karmaşık veya çok büyük olması durumunda cerrahi müdahalede bulunmak ve alternatif tedaviler geliştirmek önemli olmaktadır. Klinik sorunları çözmek amacıyla biyolojik kaynak sağlamayı amaçlayan kemik doku mühendisliği ise son yıllarda ilerleme kaydederek kemik dokusu onarımı için umut verici ürünlerin geliştirilmesine imkân sağlamaktadır. Özellikle önemli biyofaktörlerinin ve kemik kök hücrelerinin etkisinin anlaşılması etkili bir rejeneratif tıp için çok önemli kabul edilmektedir (Manzini vd., 2021).

Yaralanma ve hastalıkların tedavisinde kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik malzeme tasarımı oldukça önemli kabul edilmektedir. Kemik doku mühendisliği için başarılı malzeme tasarımı, doğal kemik dokusunun bileşimi ve yapısının anlaşılmasının yanı sıra polimerler, biyoseramikler, metaller ve kompozitler gibi biyomimetik doğal veya ayarlanabilir sentetik materyallerin (biyomalzemeler) uygun seçimini gerektirmektedir. Üç boyutlu baskı ve elektrik alanı destekli teknikler de dahil olmak üzere yapı mimarisi üretimi için geliştirilen teknolojiler, uygun biyomalzemeleri kemik doku mühendisliği için ideal formlara dönüştürmek için kullanılmaktadır. Son yıllarda; tıp, biyoloji, malzeme ve diğer disiplinlerin entegrasyonu, kesişmesi ve gelişmesiyle birlikte biyomalzemeler kemik doku mühendisliği iskelelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak halen günümüzde, kemik doku rejenerasyonu için ideal malzemelerin geliştirilmesinde karşılanmayan ihtiyaçlar ve mevcut zorlukların bulunması yeni stratejilerin geliştirilmesine olan ihtiyacı ortaya koymaktadır (Koons vd., 2020).

Yapılan araştırmalar; mikrobiyota kaynaklı biyotiklerin bağırsak mikrobiyota bileşimi ile kemik homeostazisi (Quach ve Britton, 2017) ve bağırsak-kemik sinyalleşmesinde (Schepper vd., 2017) önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Son yıllarda biyotikler

arasında dikkat çeken ve yeni bir terim olarak nitelendirilen postbiyotikler; kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), mikrobiyal hücre fraksiyonları, fonksiyonel proteinler, hücre dışı polisakkaritler (EPS), hücre lizatları, teikoik asit, peptidoglikan türevli muropeptitler dahil olmak üzere fermantasyon işlemi sırasında probiyotikler tarafından üretilen fonksiyonel biyoaktif bileşikler içerir. Doktora tez çalışması, rat kalvaryumu kritik boyutlu defekt modelinde köpek ve kedi mikrobiyotaya kaynaklı postbiyotiklerin kemik rejenerasyonu üzerine etkisini belirlemeyi amaçlamaktadır. Bu araştırma, kedi ve köpek mikrobiyotası kaynaklı postbiyotiklerin kemik sağlığı üzerindeki etkilerini inceleyen ilk çalışmadır.

## **1.1. Kemik Dokusu**

İnsan vücudunun iskeletini oluşturan ve iç destek sistemi olarak görev yapan kemik, toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. Bu karmaşık, aktif ve hiyerarşik doku, vücut hareketini ve hareket kabiliyetini desteklemektedir. Bununla beraber, kan hücrelerinin üretiminde, motor fonksiyonlarda ve mineraller ile büyüme faktörlerinin (BF) depolanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Fizyolojik işlevleri, bölünme, göç ve farklılaşma gibi hücre işlevlerinin kritik düzenleyicileri olan BF'lerin ve sitokinlerin üretiminden sorumlu olan kök hücrelerin varlığıyla derinden ilişkilidir (Roseti vd., 2017; Toosi ve Behravan, 2019).

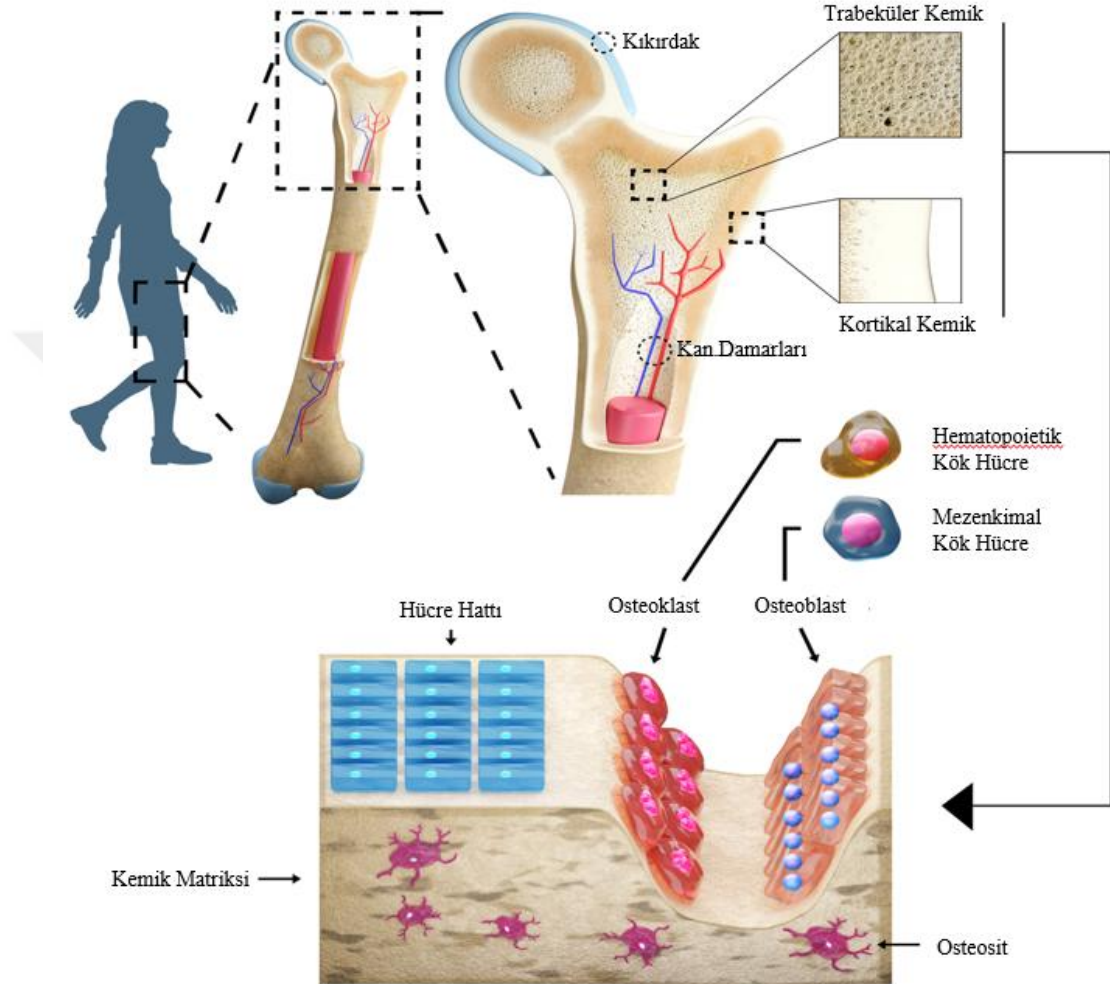
Kemik dokusu son derece dinamik, vaskularize ve yara izi bırakmadan kendi kendini onarma becerisine sahip önemli bir dokudur (Birkhold vd., 2015). Bununla birlikte; kemik yaralanmaları ve artan yaşa bağlı etkiler sıklıkla osteoporozla sonuçlanan kemik kaybına yol açabilmektedir (Chocholata vd., 2019). Günümüzde kemik rejenerasyonuna yönelik tedaviler arasında otojen, allojenik veya ksenojenik kemik grefti nakli gibi seçenekler yer almaktadır (Shang vd., 2020).

### **1.1.1. Kemik Yapısı ve Morfolojisi**

İnsan vücudunda, yapısal bir işlev gösterebilen ve hayati organları koruyabilen, farklı morfoloji ve boyutlarda 200'den fazla kemik bulunmaktadır. Mimariye bağlı olarak kemik dokusu çift katmanlı bir yapıya sahiptir (Şekil 1.1). Dış katman, yetişkin toplam kemik kütlelerinin yaklaşık %80'ini oluşturan ve %3-5 oranında nispeten yoğun bir gözenekliliğe sahip olan kortikal veya kompakt kemiktir. Bal peteği şeklindeki trabeküler bağlantının iç tabakası tarafından oluşturulan süngerimsi kemik, yaklaşık %80-90'lık yüksek gözenekliliğe

sahip yetişkinlerde toplam kemik kütlelerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Parfitt vd., 2002).

**Error!**



**Şekil 1. 1.** Trabeküler ve kortikal morfoloji ve kemik hücreleri (Manzini vd., 2021)

Trabeküler kemik daha gözenekli bir yapıya sahip olup, kortikal kemiklerle karşılaştırıldığında kompresyona karşı daha az direnç sağlamaktadır. Güçlü gözenekli ağ yapısı aşırı koşullar altında bile kırık riskini en aza indirmek için fonksiyonel olarak kuvvetlerin dağılımına izin vermektedir. Trabeküler kemik, sünger şekli nedeniyle geniş bir yüzey alanı sunmakta, bu da daha fazla metabolik aktiviteye yol açmaktadır. Bu morfoloji ise besinlerin, biyomoleküllerin ve gazların değişimine izin vermektedir. Trabeküler kemik, diğerlerinin yanı sıra femur ve humerus gibi uzun kemiklerin ve yassı kemiklerin (çene ve kafatası) metafizinde bulunabilmektedir. Kortikal kemik, uzun kemiklerin diyafizinde

bulunmakta ve daha az sayıda gözenek içermektedir. Destek işlevinde önemli bir rol oynayan bu kemikler; femur ve kaval kemiği gibi uzun kemikler, kafatası gibi yassı kemikler, ayak bileği ve el bileği gibi kısa kemikler olmak üzere üç alt türe ayrılmaktadır. Bu kemiklerin temel mimarisini birbirine çok yakın konumlanmış, osteon adı verilen yapılar oluşturmaktadır. Bu desen onu eğriliğe karşı etkili bir şekilde dirençli hale getirmektedir. Yaşla birlikte kortikal kemikte daha fazla gözeneklilik ve daha az kalınlık gözlemlenmek mümkün olmaktadır (Andreasen vd., 2018).

Kemiklerin bu morfolojik özellikleri vücudun yapısal taleplerini desteklemeye, güç ve dayanıklılık sağlamaya yeterlidir. Karşılaştırmalı olarak, kemik dokusunun enerjiyi absorbe etme ve salıverme yeteneği meşeden iki kat daha yüksek, nihai gerilme mukavemeti ise dökme demirinkine benzer olarak değerlendirilmektedir (Andreasen vd., 2018).

### **1.1.2. Kemik Hücreleri**

Osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar yaşam boyunca sürekli değişime uğrayan ve dinamik bir yapıya sahip olan kemik dokusunun hayatta kalması ve aktivitesi için tamamlayıcı ve kritik öneme sahiptir. Osteoblast hücreleri, küboidal morfolojiye sahip olup kemiğin katmanlı kaynağından sorumludur. İşlevsel olarak kemik dokusu oluşturabilmekte ve kemiğin yeniden şekillenmesi ve mineralizasyonunda rol oynamaktadır. Ayrıca bu hücreler, kemik matriks proteinleri gibi başka proteinleri ile kemik dokusu restorasyonunun katabolik sürecine katılan proteinleri de üretebilmektedir. Bazen osteoblast hücreleri kendilerini kalsifiye matrikslerine bağlayabilmekte, bu da fenotiplerinde değişikliklere ve osteositlere farklılaşmalarına yol açabilmektedir. Bu farklılaşma süreci esas olarak transkripsiyon faktörü 2 (RUNX 2) tarafından düzenlenmektedir. Farklılaşma sürecinde hücreler, osteopontin, osteonektin gibi hücre dışı matriks (HDM) proteinlerini üretmektedir. Alkalen fosfataz gibi mineralizasyon sürecine katılan enzimler, osteoblast hücrelerinde bu süreçte oldukça aktiftir. Osteoblastların bu sürekli farklılaşma mekanizması fenotipik heterojeniteden sorumludur. Bir grup farklılaşmış osteoblast, mineralize olmayan organik matriksi yapılandıran osteoidleri üretmektedir. Bu osteoidler ise, mekanik uyarıların iletilmesinde önemli bir rol oynayan osteositlere dönüşmektedir (Martin vd., 2019).

Osteosit hücreleri yetişkin kemiğindeki merkezi ve en bol bulunan hücreler olarak tanımlanmaktadır. Mineralize kemik içinde bir ağ oluşturmaktan sorumludurlar. Morfolojik olarak boyutları daha küçük olup, daha belirgin çekirdek/sitoplazma oranına sahiptirler

(Chen vd., 2018). İşlevsel olarak osteositler; mekanosensitivite ve mekanotransdüksiyondan sorumludur. Mekanotransdüksiyon; fiziksel kuvvetlerin hücrel tepkilerle sonuçlanan biyokimyasal sinyallere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır. Kemikte bu süreç, mekanik bağlanmayı ve ardından biyokimyasal bağlanmayı içermektedir. Daha sonra sensör hücresi tarafından yakalanan sinyalin, uyarana yanıtın üretilmesinden sorumlu olacak efektör hücreye iletilmesi gerçekleşmektedir. Bu süreçte kuvvet artışı olduğunda osteoblastlar aktive olmakta ve kemik oluşumunun daha belirgin olduğu bir dönem ortaya çıkmaktadır. Aksi takdirde osteoklast aktivitesinde artış olmakta, bu da doku oluşumunun azalmasına ve emilim sürecinin artmasına neden olmaktadır. Her iki durumda da osteositler, hücrel aktiviteleri koordine ederek, bir olayı veya diğerini tetikleyecek farklı uyarıları serbest bırakmaktadır (Huang vd., 2019). Uygulanan mekanik yükün biyokimyasal olaylara dönüşmesi sonucu ortaya çıkan nitrik oksidin (NO) birincil üreticileridirler. Bu süreçlerin dengesi yaş, cinsiyet, fiziksel aktivite gibi faktörlerden doğrudan etkilenebilmektedir. Biyokimyasal olarak, fiziksel kuvvetler ve biyokimyasal sinyaller arasındaki iletim, diğerlerinin yanı sıra hücre içi iyon kanallarının, hücre içi sinyalleşmenin, integrinler gibi transmembran moleküllerinin varlığıyla ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, mekanotransdüksiyonda yer alan biyolojik süreç her zaman karmaşık olup çeşitli moleküler sinyalleşme mekanizmalarına bağlı olmaktadır (Martin vd., 2019). Bunun yanı sıra osteositler, koloni uyarıcı faktör 1 (CSF-1) ve nükleer faktör Kappa-B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü gibi faktörler üreterek kemiğin yeniden şekillenmesini desteklemektedir. Bu hücrelerin duyarlılığı, kemiğin mekanik yüke uyum sağlamasına ve böylece kemik dokusu kütlesinin değişmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca osteositler sinyal faktörlerini salgılayarak osteoblast ve osteoklast fonksiyonlarını düzenleyebilmektedir (Huang vd., 2019). Dinamik bir özelliğe sahip olan kemik, mekanik uyarılara yanıt olarak bileşimini ve yapısını değiştirebilmekte, uygulanan bu yüklere, hormonal veya genetik düzenlemeye bağlı yanıtları tetikleyebilmektedir (Martin vd., 2019).

Osteoklastlar, RANKL oluşumunda ve farklılaşmasında hayati bir rol oynayan, makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) osteoklast öncü hücrelerinin hayatta kalmasına ve sayısının korunmasına müdahale eden ve matriks enzimlerinin sentezini düzenleyerek mineralize kemiği yeniden resorbe etme konusunda yüksek bir kapasiteye sahip olan kemik hücre grubudur (Xiao vd., 2016). Osteoblastlar kemik yapan hücrelerken osteoklastlar kemik matriksi ve yaşlı osteositler de dahil olmak üzere eski kemik dokusunu rezorpsiyon için sindiren hücreler olarak tanımlanmaktadır. Aşırı rezorpsiyon nedeniyle rezorpsiyon ve kemik

oluşumu arasındaki dengenin bozulması ise kemik hastalıklarına yol açmaktadır (Huang vd., 2019).

### 1.1.3. Kemik Oluşum Süreci

Kemik dokusunu intramembranöz ossifikasyon ve endokondral ossifikasyon olmak üzere iki farklı mekanizma oluşturmaktadır. Klavikula, kafatası ve kranial kemiklerin çoğu gibi düz kemiklerde intramembranöz ossifikasyon meydana gelmektedir. Bu mekanizma mezenkimal kök hücrelerin bir küme oluşturacak şekilde bir araya gelerek kemikleşme merkezinde toplanan osteoblastlara farklılaşmasını içermektedir. Daha sonra osteoblastlar, kollajen-proteoglikan açısından zengin ve kalsiyumu bağlayabilen, osteoid adı verilen mineralize olmayan bir matris salgılamaya başlamaktadır. Bu şekilde matris sertleşmekte ve osteoblastlar bağlanarak bunların osteositlere farklılaşması sağlanmaktadır. Bu süreçte osteoblastlar, kan damarlarını çevreleyen osteoidleri üretmeye devam etmektedir. Bu mekanizma trabeküler kemiği ve kemik iliğini oluşturmaktadır (Breeland ve Menezes, 2020).

Endokondral ossifikasyon, embriyogenez sırasında meydana gelmekte olan kemik matriksi oluşumu, osteoblast farklılaşması ve ossifikasyon olmak üzere üç temel süreci içermektedir (Martin vd., 2019). Bu süreçte, mezenkimal kök hücreler kondrositlere farklılaşmakta ve proliferatif süreci engelleyebilecek moleküller salgılamaya başlayana kadar kıkırdak matrisi üretmektedir. Daha sonra uzun kemiğin orta bölgesinde kıkırdak yerine kemik oluşumuna yönelik mezenkimal kök hücrelerden oluşan bir periost tabakası belirlemektedir (Inoue vd., 2020). Kondrositler hipertrofik hale gelmekte ve matris kalsifikasyonunda çalışan aktif proteinleri üretmektedir. Bu süreç, kemik periosteumunun bir kısmının bozulmasına ve iç matrisin bir kısmının emilmesine neden olarak ilk kan kılcal damarlarının ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Ayrıca medüller boşlukta vaskülarizasyonu teşvik etmek için hipertrofik kıkırdağa hücrel göçü sağlamaktadır. Bu süreçte, yeni bir mezenkimal kök hücre grubu osteoblastlara farklılaşmakta ve kalsifiye bir kemik matriksi üretmektedir. Bu kemik daha sonra yeniden modellenmekte ve daha organize kollajen liflere ve üstün mekanik özelliklere sahip olan trabeküler kemiği oluşturmaktadır (Martin vd., 2019).

Kemik oluşum aşamalarını, biyokimyasal faktörler ve biyomekanik faktörler kontrol etmektedir. Osteogeneze ve kemik büyümesine doğrudan müdahale eden endojen elementler kemik türüne göre değişiklik sergilemektedir. Bunlar, diğer sinyal faktörlerinin yanı sıra tiroid ve östrojen, insülin benzeri büyüme faktörleri, D vitamini, retinoidlere yanıt veren nükleer reseptörler, glukokortikoidler gibi farklı hormon türleri olabilmektedir (Vaca-Gonzalez vd., 2018). BF'ler kemik dokusu hücreleri ve diğerleri tarafından salgılanan, işlevlerine göre otokrin, parakrin ve endokrin etkili faktörlerdir. Hedef hücrelerin hücre zarında bulunan spesifik reseptörlerine bağlanan BF'ler hücre büyümesi, göçü, çoğalması, farklılaşması ve kemik dokusu yenilenmesi gibi çeşitli metabolik fonksiyonları tetiklemektedir (Toosi ve Behravan, 2019). Bu ailenin önemli bir üyesi, hücre farklılaşmasını, fonksiyonunu ve göçünü düzenleyerek çeşitli organların gelişimini kontrol etme görevi gören transforme edici büyüme faktörüdür (TGF). TGF süper ailesi içinde kemik ve kırık dokusu üretimi ve onarımı yapabilen yaklaşık 20 tip protein bulunmaktadır. Kemik morfogenez proteinleri (BMP), mezenkimal osteoblastlara farklılaşmasını uyaran osteoindüktif potansiyele sahiptir (Barcak ve Beebe, 2017). Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ise, yedi aileye bölünmüş 22 üyeden oluşmakta ve embriyonik ve organ gelişimi, metabolizma ve kemik oluşumunun düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik işlevlerde görev yapmaktadır (Richter ve Faul, 2018). Tip 1 insüline benzer büyüme faktörü (IGF) ise, farklı dokulardaki diğer büyüme ve farklılaşma süreçleri için gerekli olmasının yanı sıra kemik oluşumunu da etkilemektedir. Bu faktör, büyüme hormonuna yanıt olarak karaciğerde üretilen küçük bir peptittir. Kemikte endokrin, parakrin ve otokrin faktörler IGF-1 aktivitesini modüle etmektedir. IGF-1 olgun kemik hücrelerini etkileyerek osteokalsin, osteriks ve kollajen tip I'in ekspresyonunu teşvik etmektedir. Ayrıca, iyi bir endokondral ossifikasyon için gerekli olan kondrosit fonksiyonlarını düzenlemektedir. Kondrositler, osteositler ve osteoblastlardaki IGF-1 reseptör düzeylerinin azalması, kontrolsüz hücre çoğalması ve farklılaşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, IGF-1 düzeylerinde azalmayı tetikleyen bozukluklar, diğerlerinin yanı sıra osteoporoz gibi kemik kütlesi kaybıyla ilgili hastalıklara yol açabilmektedir (McLaughlin vd., 2020).

Kemik dokusunun vaskülarizasyonunun çok yüksek olması, kırık oluşumu ve rejenerasyon gibi süreçlerin gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir. Hipertrofik kondrositler, osteoblastlar gibi kemik hücreleri vasküler hücrelerle iletişim kurmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyojenik faktörlerin üretimini düzenleyerek dokudaki yeni kan damarlarının istilasını uyarmaktadırlar. Anjiyogenez adı verilen bu süreç, kemik oluşumu için gerekli olan oksijeni, besin maddelerini ve mineralleri

sağlamaktadır. VEGF, primer osteoblastlarda enzim alkalın fosfataz (ALP) aktivitesini tetiklemekte ve osteoblastların ve osteoklastların kemik oluşum bölgelerine göçünü ve farklılaşmasını indüklemektedir. RUNX2 gibi faktörler, bu hücreler tarafından VEGF salınımına aracılık ederek ilişkili süreçleri düzenlemektedir (Vaca-Gonzalez vd., 2018). Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 olarak da bilinen RUNX2, kondrojenezin geç evresi sırasında olgunlaşmamış osteoblastlar tarafından eksprese edilen transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. Ekspresyonu, hepatosit büyüme faktörünün (HGF) serbest bırakılmasıyla desteklenen bir sinyalleme zincirinin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu protein, kemik morfogenezini bağlamında osteoblastların farklılaşmasını ve hücre döngüsünü aktif olarak düzenlemektedir (McLaughlin vd., 2020). Osteokalsin ise osteoblastlar tarafından salgılanan, glukozun mobilizasyonuna yardımcı olan ve enerji tüketimini artıran bir hormondur. Kemik mineralizasyonunda önemli bir rol oynamanın yanı sıra kalsiyum iyonları homeostazisine de katılmaktadır (Huang vd., 2019).

#### **1.1.4. Kemik Yeniden Yapılanması**

Yeniden yapılanma, osteoklastlar tarafından rezorbe olmuş trabeküler kemiğin osteoblastların aktivitesiyle doldurulmaya bırakılması sürecidir. Bu düzenlemede yer alan faktörler, BF ve hormonlar gibi biyokimyasal veya mekanik olabilmektedir. Kemik hücreleri mekanik bir uyarıyı tanımakta ve bunları mekanotransdüksiyon adı verilen bir süreçte biyokimyasal reaksiyonlara dönüştürebilmektedir (Siddiqui ve Partridge, 2016). Sonuç olarak, hücrel bir tepki kemik dokusunun büyümesini veya emilimini tetikleyebilmektedir. Yetişkin insanda yeniden yapılanma, günlük fiziksel yük ve yaşlanma etkilerinden kaçınma ve sonuçlarıyla ilgili eski hasarlı kemik restorasyonu için en aktif ve dinamik süreçtir. Bu mekanizma, 3 ile 6 ay arasında kemik onarımını desteklemekte olup yük dağılımı, beslenme ve metabolik çeşitlilik, yaralı veya ölü dokuların yenilenmesi gibi değişikliklere uyum sağlama yeteneğini içermektedir (Huang vd., 2019).

#### **1.1.5. Kırık İyileşmesi**

Kemik dokusu çoğu kırığı onarabilmesine rağmen, lezyon karmaşık olduğunda genellikle yaralı dokuyu iyileştirmek için invazif bir prosedür gerekli olmaktadır. Genel olarak kemik kırığı onarım süreci, üç ana aşamayı içeren embriyonik kemik oluşumu aşamasına benzemektedir. İnflamatuar aşama, lezyon bölgesinde kan pıhtısı oluşturan ilk ve en hızlı aşamadır. Kemotaksis yoluyla fagositik hücreleri yaralanma noktasına çekmekte ve

kırık iyileşmesinin bu aşamasında hem adaptif hem de doğuştan gelen immün yanıt kritik öneme sahip olmaktadır. Ancak, mezenkimal kök hücreler immün baskılayıcı parakrin faktörleri serbest bırakarak dengenin korunmasında kilit rol oynamaktadır (Einhorn ve Gerstenfeld, 2015). Osteoblastlar pıhtıyı kapladığında onarım adı verilen ikinci aşama başlamaktadır. Bu hücrelerin yoğun bir şekilde çoğalması ve ayrıca osteoblastlara farklılaşan mezenkimal kök hücrelerin göçü gerçekleşmektedir. Kırık mekanik olarak stabil değilse, mezenkimal kök hücreler etkilenen bölgede bir yapı oluşturmak için kondrositlere farklılaşarak kemik kallusunu oluşturmaktadır. Bu kondrosit farklılaşma süreci HDM mineralizasyonu ile sonuçlanmaktadır. Son aşama olan yeniden modellemede ise, katabolik aktivite ile kırıldak emilimi kallus hacminin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca anjiyogenez süreci devam etmekte ve kemik oluşumu lamel kemiğe yol açmaktadır (Agarwal ve Garcia, 2015).

Kök hücrelerin yanı sıra, diğer sinyal ajanları ve birçok BF'de kırık iyileşme sürecine aktif olarak katılmaktadırlar. TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi proinflamatuvar sinyal faktörleri, kemik dokularının oluşumunda ve yeniden şekillenmesinde önemli rol oynayarak immün ve inflamatuvar yanıtı düzenlemektedir (Huang ve Ogawa, 2010).

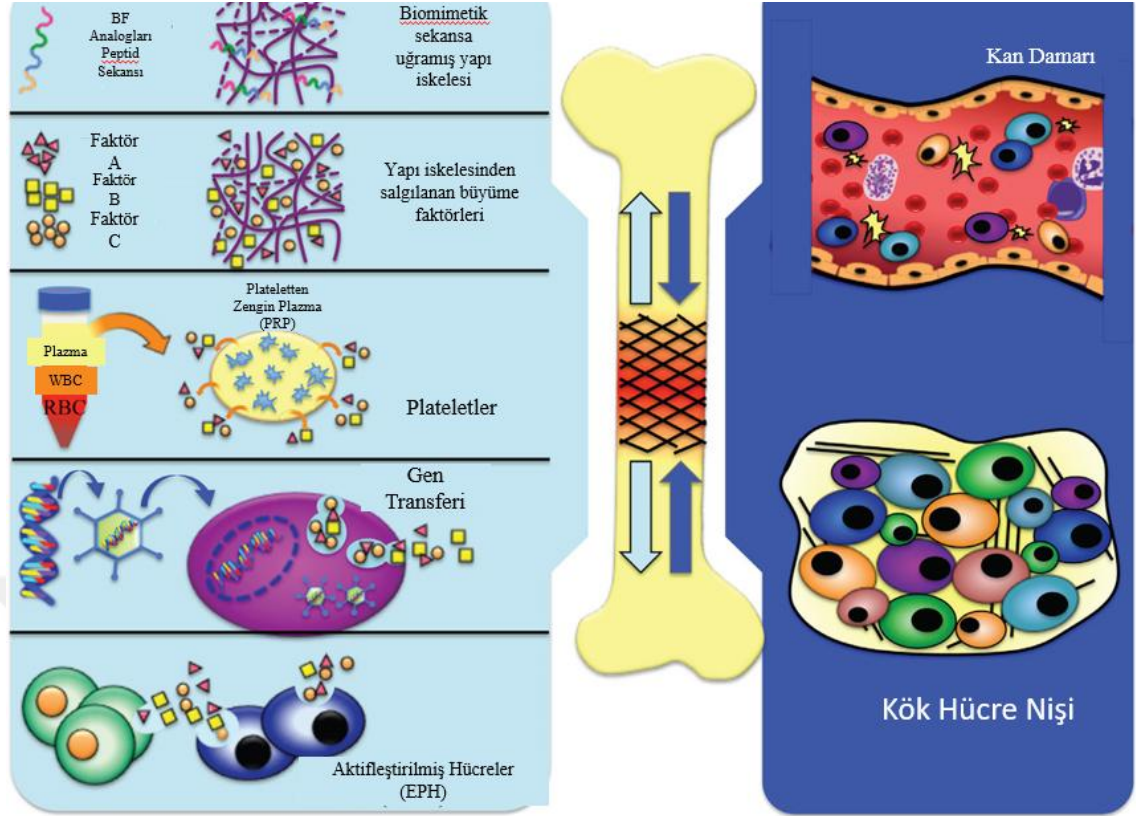
Ağır travma, doğuştan yetersizlik, osteoporoz ve tümör rezeksiyonu gibi durumlardan kaynaklanan kritik büyüklükteki kırıklar dünya çapında önemli tıbbi zorluklardır (Raina vd., 2020). Her ne kadar kemik dokusu kendi kendini iyileştirme potansiyeline sahip olsa da lezyon boyut sınırını aştığında genellikle invazif bir cerrahi yaklaşım uygulanması gerekli olmaktadır (Liu vd., 2019). Dolayısıyla, kök hücreler, sinyal faktörleri ve osteoindüktif maddeleri içeren ve iyileşmeyi destekleyen ürünler geliştirmek önemli olmaktadır. Bu ihtiyaç, kemik onarımı ve lokal ve sistemik tedaviler için kemik doku mühendisliği alanında yapılacak yeni keşiflere dikkat çekmektedir.

## **1.2. Kemik Doku Mühendisliği**

Kemik doku mühendisliği, kemik onarımını ve yenilenmesini teşvik etmek için iskeleleri, iyi entegre olmuş hücreleri ve biyoaktif faktörleri kullanarak rejeneratif tıp için yenilikçi bir platform sağlayan doku mühendisliği alanının önemli bir alt dalıdır. Kemik onarımına yönelik ilk araştırmalar, kalsiyum fosfatların ve biyolojik olarak emilebilen metallerin kullanımını içermektedir. Bunu polimerik malzemelerde kemik oluşumunun gözlemlenmesi ve canlı dokulara bağlanabilen ilk insan yapımı malzeme olan biyocamin

icadı takip etmiştir. Daha ileri çalışmalar, proteinler ve peptitler gibi biyoaktif moleküllerin tanımlanmasına yol açmış ve ardından kemik doku mühendisliği ayrı bir araştırma alanı olarak önem kazanmıştır. Bu kapsamda günümüze kadar farklı malzeme türleri kullanılarak iskeleler tasarlanmış ve spesifik biyolojik tepkileri tetikleyecek şekilde değiştirilmiştir. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere düzenleyici kurumlar çeşitli biyomalzemeler içeren ürünleri değerlendirmiş ve birçok ticari ürünü klinik kullanıma uygun olarak onay almıştır (Loons vd., 2020).

Kemik doku mühendisliği araştırma alanı, kemik otogreftleri ve allogreftlerden daha iyi performans gösteren malzemeler tasarlamayı amaçlamaktadır. Genel amaç, bir kemik defektine uygulanabilecek ve daha sonra alıcı hastanın kendi hücreleri tarafından yeniden şekillendirilebilecek materyaller hazırlamaktır. Bu malzemeler genellikle hücresel bağlanma ve mineralize matrisin birikmesi için destekleyici bir yapı görevi gören ve doku oluşturmada HDM'nin rolünü geçici olarak yerine getirmesi amaçlanan bir iskele formunda birleştirilmektedir. Kemik doku mühendisliği paradigmasının şematik gösterimi Şekil 1.2'de sunulmaktadır.



Şekil 1. 2. Kemik dokusu mühendisliği paradigması (Amini vd., 2013)

Konakçı tepkisini etkileyen defekt bölgesindeki implante edilmiş greft, BF'leri ve çeşitli hücreleri içerebilmektedir. Buna yanıt olarak hücre yerleşimi ve gelişmiş vaskülarizasyon ve kemik rejenerasyonu meydana gelmektedir. Kusur bölgesine ve hastanın sağlık durumuna bağlı olarak, seçilen stratejinin kullanılabilirliğini sağlamak için farklı yapısal ve fonksiyonel malzeme özellikleri gerekli olmaktadır. Kemik doku mühendisliğine yönelik malzemelerin tasarımı aynı zamanda hücreSEL ve vasküler infiltrasyona yardımcı olan gözenekli mimari ve kemik matrisinin çok ölçekli organizasyonu ve hiyerarşisi gibi sağlıklı kemik dokusunun işlevi için kritik olan özellikleri tarafından da yönlendirilmektedir (Du vd., 2019).

Kemik doku mühendisliği malzemelerinin tasarımcıları genellikle yeni kemik dokusunun büyümesini kolaylaştırmak ve desteklemek ve işlevselliğini geri kazandırmak için kemiğin protein, mineral ve hücreSEL bileşenlerinin fiziksel yapılarını ve/veya işlevlerini taklit etmeyi amaçlamaktadır. Bu amaçla ideal biyomalzemeleri, uygun hücreleri ve gerekli biyolojik sinyalleri bir araya getirmektedir (Koons vd., 2020).

### 1.2.1. Biyomalzemeler

Biyomalzeme, kemik doku mühendisliğindeki üç temel unsurdan biri olup doku yenilenmesinin iskeletini oluşturmaktadır. Kemik rejenerasyonunda kullanılan biyomalzemeler inorganik materyaller, organik materyaller ve kompozit materyaller olarak alt kategorilere ayrılabilir.

İnorganik malzemeler, yüksek mekanik dayanıma sahip olan ve kolayca deforme olmayan ve bozunmayan tıbbi metal malzemeleri ve metal olmayan malzemeleri içermektedir. Metal malzemeler dikkat çekici mekanik özellikleri nedeniyle yük taşıyan kemik defektleri açısından kemik onarımı için ideal kabul edilmektedir. Metal bazlı biyomalzemeler arasında titanyum, kobalt ve magnezyum bazlı alaşımlar bulunmaktadır. Günümüzde titanyum (Ti) ve alaşımları klinik uygulamalarda yaygın olarak kabul görmektedir. Kliniklerde kullanılan titanyum bazlı alaşımlar saf Ti ve titanyum alaşımı Ti6Al4V ile temsil edilmektedir (Albrektsson, 1986). Saf Ti, fizyolojik bir ortamda yeterli korozyon direncine sahip olmasına rağmen zayıf gücü ve direnci daha fazla klinik kullanımını sınırlamaktadır. Saf Ti ile karşılaştırıldığında Ti6Al4V, optimum mekanik dayanıma, esnekliğe ve yorulma direncine sahiptir. Diğer çeşitli metal malzemelerle karşılaştırıldığında titanyum bazlı alaşımın elastik modülü, ortopedi alanındaki uygulamalar için uygun olan doğal kemiğe oldukça yakın kabul edilmektedir (Wang vd., 2020). Bununla birlikte, titanyumun korozyona karşı direnç gösterme ve kemiğe bağlanma yeteneği yoktur. Bu nedenle biyolojik aktivitesini ve korozyon direncini arttırmak için biyo-yapışkan kaplamalar ve kompozit kaplamalar dahil olmak üzere sıklıkla yüzey kaplamalarının eklenmesi gerekli olmaktadır (Doi vd., 2020). Ancak çoğu metal malzemenin bozunma oranı son derece düşük olduğu için implantasyonu takiben bazılarının çıkarılması için ikincil ameliyat gerekli olmaktadır. Son 20 yılda gerçekleştirilen çalışmalar, mevcut tıbbi metal malzemelerin sertlik, korozyon direnci ve biyouyumluluk özelliklerinin değiştirilmesine odaklanmaktadır. Biyoseramikler; olumlu biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, osteo-iletkenlikleri ve osteo-indüksiyon özellikleri nedeniyle kemik araştırmalarında önemli malzemeler olarak nitelendirilmektedir. Kemik doku mühendisliği araştırmalarında kullanılan biyoseramikler arasında, hidroksiapatit (HA),  $\beta$ -trikalsiyum fosfat ( $\beta$ -TCP), bifazik kalsiyum fosfat (BCP), biyocam vb. malzemeler yer almaktadır. Metal iyonlarının veya biyoaktif iyonların katkılanması, biyoseramiklerin kullanımı için yeni bir yol açmaktadır. İnsan kemiği morfogenetik protein-2 (BMP-2) kaplı biyoseramik yapı

iskeleleri, osteo-indüksiyonu ve kemiğin yeniden şekillenmesini desteklemektedir (Tanaka vd., 2017).

Kollajen, kitosan, sodyum aljinat, ipek fibroin ve hyaluronik asit dahil olmak üzere doğal biyomalzemeler, doğal kemik hücre dışı matrisini simüle edebilen ve ardından doğal olarak parçalanabilen malzemelerdir. Yüksek biyoyumluluk özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği iskelelerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Deri, kemik, tendon ve bağların ana bileşeni olan kolajen yüksek şişme oranına ve düşük antijeniteye sahiptir. Bu özellikleri kolajeni kemik doku mühendisliğinde ideal bir doğal malzeme yapmaktadır. Bununla birlikte, zayıf mekanik özellikleri kemik yerine doğrudan kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle yüksek fiziksel dayanıklılığa sahip kompozit kolajen yapı iskeleleri ilgi görmektedir (Montalbano vd., 2019). Kitosan, kitinden kısmen deasetillenmiş doğal bir katyonik karbonhidrat materyalidir. Belirli biyolojik işlevlere sahip, antijenik olmayan, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen bir malzemedir. Ancak kitosanın suda çözünmemesi, *in vivo* hızlı biyodegradasyona sahip olması ve kanla uyumu zayıf olması nedeniyle kemik rejenerasyon potansiyeli sınırlı kabul edilmektedir. Araştırmacılar, kitosanı hyaluronik asit gibi diğer çeşitli malzemelerle birleştirerek kitosan yapısının işlevini geliştirmektedir. Fibrin, hücre dışı matrisin ana bileşeni olup hücreler arası sinyal iletimi ve etkileşimine aracılık etmektedir (Banihashemi vd., 2015).

Yaygın olarak kullanılan polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve polilaktik asit-glikolik asit kopolimeri (PLGA) dahil olmak üzere sentetik polimer malzemeler, kemik rejenerasyonu için geniş çapta araştırılmaktadır. Polimetil metakrilat (PMMA) kemik çimentosu, hızlı sertleşme hızı ve daha iyi mekanik mukavemeti nedeniyle klinik uygulamada kullanılan bir materyaldir. Ancak, kemik çevresindeki dokuda hafif hasara neden olduğu bilinmektedir ve monomerinin biyolojik toksisitesi kanıtlanmıştır (Sas vd., 2021; Xu vd., 2021). Bununla birlikte, PMMA'nın defekt alanındaki düşük biyobozunma oranı, yeni kemiğin büyümesini olumsuz yönde etkileyebilmekte, bu da gelecekteki klinik kullanımda kemik defektinin rejenerasyonu ve onarımına elverişli olmamasına neden olabilmektedir (Hoess vd., 2016). Son yıllarda polimer malzemelerin hızla gelişmesi nedeniyle, yeni bir biyoyumlu yüksek performanslı polimer olan polietereter keton (PEEK), FDA tarafından implant cihazı olarak onaylanmış ve biyomedikal alanda yavaş yavaş uygulanmaya başlanmıştır. 4,5 GPa'lık elastik modül dahilinde PEEK, insan vücudunun normal fizyolojik ihtiyaçlarını karşılayabilen insan kemiğine daha yakın özellikler sergilemektedir (Lin vd., 2019). PEEK; iyi biyoyumluluk, ısı direnci, korozyon direnci vb.

özelliklerinden dolayı 21. yüzyılın en umut verici malzemesi haline gelen organik bir termoplastik polimer olarak nitelendirilmektedir.

### 1.2.2. Hücreler

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında kemik iliği veya yağ dokusu gibi dokulardan izole edilebilen kök hücreler yıllardır kemik defektlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Yousefi vd., 2016). Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (BMSC'ler), kemik iliği stromal fraksiyonundan elde edilen heterojen bir hücre popülasyonudur (Elsafadi vd., 2016). *In vitro* çalışmalarda, BMSC'ler hızla çoğalabilmekte ve adiposit, kondrositler ve osteositler gibi çeşitli mezodermal soylara farklılaşabilmektedir. Bu da osteokondral tendon, yağ ve kas rejenerasyonuna büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır (Almubarak vd., 2016). 2001 yılında, büyük kemik defektlerine sahip üç hasta, ilk klinik deney için BMSC'ler olarak başarıyla tedavi edilmiştir.

Adipoz kaynaklı kök hücreler (ADSC'ler), BMSC'lerle karşılaştırılabilir morfoloji ve fenotipe sahip, yağ dokusundan izole edilebilen bir stromal hücre popülasyonudur. Ekstraksiyonu kolay olan ADSC'ler çok fonksiyonlu farklılaşma yeteneğine sahiptir (Sheykhhasan vd., 2019). Vücuda implante edildikten sonra yerel bölgenin fizyolojik, patolojik, stres ve diğer mikro ortamlarına uyum sağlayabilmekte ve osteojenik aktiviteyi koruyabilmektedirler (Fukunishi vd., 2018). Travma sonrası kalvarial defekti olan 7 yaşında bir pediatrik hastada gerçekleştirilen bir çalışma, otolog ADSC'lerin, fibrin yapıştırıcı ve biyolojik olarak parçalanabilen iskele ile başarılı bir şekilde tedavi edildiğini göstermiştir. Bilgisayarlı tomografi analizine dayanarak ameliyat sonrası yeni kemik oluşumunun yanı sıra nispeten tam kalvarial devamlılık oluşturulabilmiştir (Mizuno vd., 2008). Kemik doku mühendisliğinin sürekli gelişmesiyle birlikte araştırmacılar, kemik kusurlarını onarabilecek diğer potansiyel kök hücrelere odaklanmaktadır. Günümüzde, embriyonik kök hücreler (ESC'ler), periosteumdan türetilen hücreler (PDC'ler), diş pulpası kök hücreleri (DPSC'ler), osteojenik aktiviteye sahip özellikleri ile dikkat çekmektedir (Gronthos vd., 2000; Sui vd., 2019; Tang vd., 2012).

### 1.2.3. Biyoaktif Faktörler

Büyüme faktörleri kemik doku mühendisliğinde yardımcı rol oynayan biyoaktif faktörler arasında yer almaktadır. Kemik dokusunun onarımı için kullanılan BF'ler arasında

kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (vasküler endotelial büyüme faktörü, VEGF) yer almaktadır. BMP-2, osteogeneze yanıt veren dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  protein ailesinin bir üyesidir. BMP-2 eş zamanlı olarak kemik yenilenmesini teşvik etmekte ve defekt bölgesinde anjiyogenezi uyarmaktadır. Aynı zamanda klinik uygulamada osteoindüktif büyüme faktörü olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Temel fibroblast büyüme faktörü olarak da bilinen FGF-2, FGF-1 alt ailesine ait bir BF'dir (Novais vd., 2021). FGF, osteoblastların çoğalması ve farklılaşmasında (Yun vd., 2010), anjiyogeneze ve kemik progenitörünün hücre zarı içindeki sinyal iletiminde rol oynamaktadır (Ornitz ve Marie, 2002). Bununla birlikte, yüksek dozda FGF'nin kemik oluşumunu engellediği, düşük dozun ise kemik oluşumunu arttırdığı belirtilmektedir (Gronowicz vd., 2017). VEGF anjiyogenezi teşvik etmekte ve aynı zamanda osteojenik süreci de düzenleyebilmektedir. Osteoblast kaynaklı VEGF, mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara olan hücre farklılaşmasını uyarabilmekte ve kemik homeostazisinin korunmasında anahtar bir rol olarak adipositlere farklılaşmasını engelleyebilmektedir (Garcia vd., 2016).

Son yıllarda araştırmacılar, birden fazla işlevi hedefleyerek ve tek bir malzemenin dezavantajlarının üstesinden gelerek iki veya daha fazla malzemeyi birleştirmeye yönelik çalışmalar gerçekleştirmektedir. Bu arayış, kemik onarımı ve lokal ve sistemik tedaviler için geliştirilebilecek yeni kemik doku mühendisliği ürünlerinin keşiflerine yol gösterebilecektir.

### **1.3. Mikrobiyota-Kemik Ekseni**

İnsan vücudu üzerinde veya içinde yaşayan tüm mikroorganizma toplulukları mikrobiyota olarak adlandırılmaktadır. Mikrobiyotanın konakçı üzerinde birçok faydalı etkisi bulunmaktadır. Bunlar arasında; vitamin üretimi, diyetten besin ve enerji sağlanması, metabolik işlevlerin desteklenmesi, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığın düzenlenmesi ve patojenik organizmalardan korunma yer almaktadır. Mikrobiyota, diyet ve çevresel faktörlerden etkilenecek şekilde şekillenmekte ve yaklaşık üç yaşına geldiğinde stabil bir hale ulaşmaktadır. Mikrobiyotadaki değişikliklerin, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, obezite, metabolik rahatsızlıklar, yetersiz beslenme, nörolojik bozukluklar, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik durumla bağlantılı olduğu belirtilmektedir (Hernandez vd., 2016).

İnsan mikrobiyotasının büyük bir kısmını oluşturan bağırsak mikrobiyotası, konakçının luminal akışında bulunan veya bağırsak mukozasına yapışan mikroorganizmaların tamamını içermektedir (Zaiss vd., 2019). Bir bütün olarak ele alındığında trilyonlarca bağırsak mikroorganizması, çeşitli sinyaller üreterek konakçıyla etkileşime girmekte ve konakçının gelişimini, fizyolojisini ve genel sağlığını etkilemektedir. Bağırsak mikrobiyotası veya spesifik mikrobiyal metabolitler, yalnızca lokal olarak konakçının inflamatuvar yanıtlarını, besin alımını veya bağırsak bariyer fonksiyonunu etkilemekle kalmamakta, aynı zamanda konakçının bağışıklık sistemi, glukoz homeostazisi, lipid metabolizması, enerji dengesi, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, adipozite ve diğer metabolik hastalıklar ile de bağlantı kurmaktadır (Fan ve Pedersen, 2021; Fei vd., 2020).

Bağırsak mikrobiyotasının kemik sağlığı üzerindeki etkileri, bağırsak mikrobiyotası ile iskelet sistemi arasındaki iletişimi ifade eden bağırsak-kemik eksenini çerçevesinde değerlendirilmektedir. Preklinik ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler, bağırsak mikrobiyotasının kemik döngüsünde kritik bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Mendel randomizasyon yaklaşımı veya poligenetik risk puanlaması yoluyla gerçekleştirilen analizler, genom çapında ilişkilendirme çalışmasından alınan bağırsak mikrobiyota istatistiklerini ve Birleşik Krallık biyobanka kohortundan alınan insan kemik mineral yoğunluğu (BMD) değerlerini kullanarak bağırsak mikrobiyotası ile topuk veya pelvis gibi farklı bölgelerdeki insan BMD değerleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir (Cheng vd., 2020; Ni vd., 2021). Gnotobiyotik hayvan modelleri ise bağırsak mikrobiyotasının kemik döngüsünün temel düzenleyicisi olduğunu doğrudan kanıtlamaktadır. Kısa süreli bağırsak mikrobiyal kolonizasyonu, GF farelerde kemik dönüşümünü teşvik ederek femur kemik kütlelerini azaltırken, uzun süreli bağırsak mikrobiyal kolonizasyonuna sahip yetişkin fareler, femurun uzunlamasına ve radyal büyümesini arttırmaktadır (Yan vd., 2016). Elde edilen veriler, spesifik bağırsak bakterilerinin kemik büyümesi ve olgunlaşması üzerindeki etkisini göstermektedir (Hathaway-Schrader vd., 2020; Tyagi vd., 2021). Ek olarak, antibiyotik müdahalesi nedeniyle bağırsak mikrobiyal homeostazisinin bozulması, kemik kütlelerini ve biyomekanik özellikleri değiştirmekte, bu da bağırsak mikrobiyotasının fizyolojik kemik yeniden yapılanması üzerinde düzenlendiğini düşündürmektedir (Rios-Arce vd., 2020).

Mikrobiyota bir bireyde oluştuktan sonra, bağırsaktaki mikrobiyal topluluğun içeriği, yüzlerce farklı türün konakçı ile ve kendi aralarındaki karmaşık etkileşimleri sonucunda, konakçının bağışıklık sistemi ile rekabet ederek dinamik bir dengeye ulaşmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasının kemik dokularını etkileyebileceği üç olası mekanizma düşünülmektedir.

Bunlarda; bağırsak epitelinde besin emiliminin düzenlenmesi, mukozal ve sistemik bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve mikrobiyal içeriklerin bağırsak endotel bariyerinden geçişi olarak tanımlanmaktadır (Hernandez vd., 2016). Bağırsak mikrobiyotasının, konakçının bağışıklık sisteminin gelişimini ve işlevini etkilediği de bilinmektedir. Bağışıklık sistemi, bağırsak mikrobiyota üyelerinin salgıladığı metabolitler ve mikroorganizmalar ile bağışıklık hücreleri arasındaki doğrudan temas yoluyla bağırsak endotel bariyerinde uyarılmaktadır. T hücreleri ve dendritik hücreler gibi bağışıklık hücreleri, bağırsak yüzeyindeki mikrobiyota üyeleri ile etkileşime geçmektedir. Bu hücreler, proinflamatuvar veya anti-inflamatuvar bağışıklık tepkilerini etkinleştirmek için lenf düğümlerine göç etmektedir. Ayrıca, bu hücreler dolaşıma çözünür proinflamatuvar veya anti inflamatuvar araçlar veya sitokinler salarak, sistemik olarak kemiğin yeniden şekillenmesini modüle edebilmektedir. Bunun yanı sıra, aktive edilmiş bağışıklık hücreleri, güçlü osteoklast-indükleyici faktör NF- $\kappa$ B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü veya diğer kemik aktif molekülleri içeren ürünleri salarak, kemik dokularına göç edebilmekte ve kemik yeniden şekillenmesini doğrudan düzenleyebilmektedir (Li vd., 2007). Mikrobiyota-kemik ekseninde meydana gelen bu biyolojik aktiviteler mikrobiyotada bulunan faydalı bakterilere ve bunların ürettikleri metabolitlere atfedilmektedir.

#### **1.4. Biyotikler**

“Biyotik” terimi, yaşamla ilgili anlamına gelen Yunanca “biotikós” kelimesinden türemiştir. Konağın, mikrobiyotasını değiştirmede sundukları destek türüne göre sınıflandırılmaktadır. Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasında değişiklikler yapmak, bağışıklık modülasyonu, çeşitli faydalı bileşiklerin üretimi, bakteriyel toksin üretiminin inhibisyonu ve bağırsak bariyer bütünlüğünün iyileştirilmesi gibi çeşitli yollarla etki gösterebilen canlı mikroorganizmalardır (Reid, 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü’nün (FAO) uzman grubu tarafından yapılan fikir birliği beyanına göre, probiyotikler “yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Wegh vd., 2019). Probiyotiklerin, patojenleri baskılayarak ve inhibe ederek bağırsak mikrobiyotasını etkilediği, ayrıca bu patojenlerin bağırsağa yapışmasını ve yerleşmesini önleyebileceği öne sürülmektedir (Collado vd., 2009; Hemarajata ve Versalovic, 2013). Ayrıca, probiyotikler bağışıklık sistemi gelişiminde, vitaminler gibi önemli besin maddelerinin sentezinde ve sıkı bağlantı sinyalleşmesinde yer alan genlerin ifadelerini arttırarak bağırsak bariyer bütünlüğünün güçlendirilmesinde rol oynayabilmektedir (Bermudez-Brito vd., 2012). Öte yandan, prebiyotikler, bağırsak

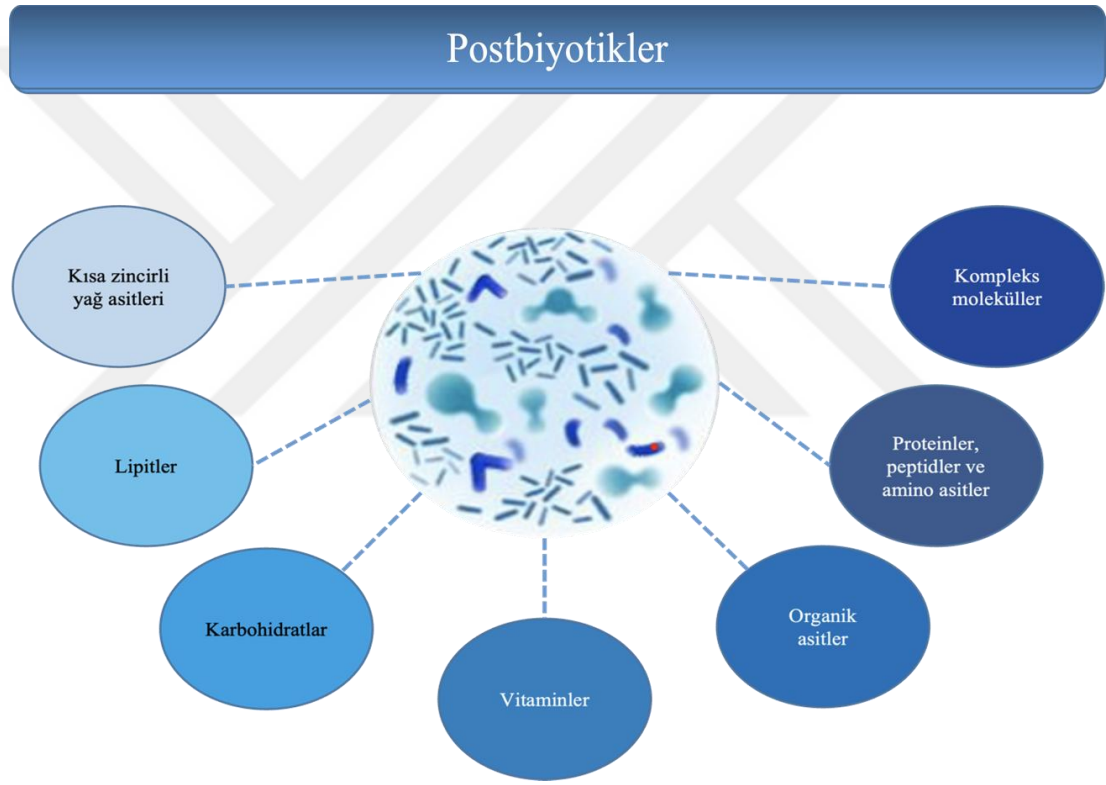
performansını artıran, metabolik verimliliği artıran, bağırsak mimarisini koruyan ve anti patojen aktiviteye sahip olan probiyotiklerin temel besin maddeleridir. Probiyotiklerin hayatta kalmasını artıran ve kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) üretimini düzenleyerek sağlık yararları sağlayan tipik olarak sindirilmemiş bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Fei vd., 2021; Wegh vd., 2019). Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği ise prebiyotikleri, konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan ve sağlık açısından yarar sağlayan bir substrat olarak ifade etmektedir (Gibson vd., 2017). Sinbiyotikler ise hem probiyotiklerin hem de prebiyotiklerin hesaplanmış karışımları olup probiyotiklerin olumlu etkilerini artırmakta ve genel sağlığı iyileştirmektedir (Gurry, 2017). Sinbiyotik içeren bebek mamalarının, inek sütü alerjisi olan bebeklerde normal büyümeyi desteklediği, bağırsak mikrobiyotasını dengelediği ve atopik dermatiti olan bebeklerde astım benzeri semptomların ortaya çıkmasını engellediği gösterilmiştir (Burks vd., 2015; Van Der Aa vd., 2011).

Faydalarına dair güçlü kanıtlara rağmen, probiyotik tüketimi, bildirilen birkaç probiyotik sepsis ve proinflatuar yanıt vakası nedeniyle endişelere yol açmaktadır. Bu nedenle, probiyotiklere alternatif olarak canlı olmayan mikrobiyal hücreleri ifade eden paraprobiyotikler veya hayalet probiyotikler ortaya çıkmıştır. Paraprobiyotikler, canlı probiyotiklerle ilişkili sepsis riski olmadan konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı olmayan bakterileri içermektedir. Dolayısıyla daha güvenli bir seçenek sunmaktadır (Taverniti vd., 2011). Bununla birlikte; probiyotiklerin veya sinbiyotiklerin sağlık üzerindeki etkilerinin çoğu, postbiyotik olarak tanımlanan ve prebiyotik tüketimini takiben probiyotikler tarafından üretilen metabolitler ile mikrobiyal fraksiyonlara bağlı olabilmektedir (Wegh vd., 2019).

### **1.5. Postbiyotikler**

Biyotik ailesinin en yeni üyelerinden biri olan postbiyotikler; fermantasyon sürecinde probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen ve sağlık üzerinde olumlu etkiler gösteren fonksiyonel biyoaktif bileşikleridir. Postbiyotik terimi, bu mikrobiyal fermantasyon bileşenlerinin tüm eşanlamlıları ve ilgili terimleri için bir şemsiye terim olarak kabul edilmektedir. Genel olarak postbiyotikler; KZYA'ları, mikrobiyal hücre fraksiyonlarını, fonksiyonel proteinleri, hücre dışı polisakkaritleri (EPS), hücre lizatlarını, teikoik asitleri, peptidoglikan türevi muropeptitleri ve pili tipi yapılar gibi birçok farklı bileşeni içerebilmektedir (Şekil 1.3). Prebiyotiklerin ve probiyotiklerin tanımları netleşmiş olsa da henüz postbiyotikler için tam bir tanım bulunmamaktadır. Ancak son yıllarda canlı

hücreler kadar etkili olduğu belirtilen postbiyotiklerin dikkat çeken özellikleri bulunmaktadır. Bunlar arasında net kimyasal yapılara sahip olmaları, güvenilir doz parametreleri sergilemeleri, memeli enzimleri tarafından hidrolize karşı direnç göstermeleri, uzun raf ömrüne sahip olmaları ve çeşitli sinyalleşme moleküllerini (mediatörler) içererek ve anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, immün-modulatör, anti-hipertansif, hipokolesterolemik, anti-karsinojenik ve anti-oksidan aktivite sergileyebilmeleri yer almaktadır. Bu özellikler, postbiyotiklerin spesifik fizyolojik fonksiyonları geliştirerek konak sağlığının iyileştirilmesine çoklu katkıda bulunabileceklerini düşündürmektedir (Aguilar-Toala vd., 2018; Nakamura vd., 2016).



**Şekil 1.3.** Postbiyotikler olarak sınıflandırılan metabolitlerin şematik gösterimi

Probiyotiklerin hedef bölgeye yeterli sayıda canlı olarak ulaşması ve stabiliteyi koruması konak üzerinde olumlu etkiler sergilemeleri için temel bir gereklilik olarak kabul edilmektedir (Lahtinen, 2012). Ancak, postbiyotikler için canlılık önemli bir kriter olarak önem taşımamaktadır. Postbiyotik etkinlik, fermantasyon sürecinde üretilen mikrobiyal metabolitler, proteinler, lipidler, karbonhidratlar, vitaminler, organik asitler, hücre duvarı bileşenleri veya diğer kompleks moleküllere dayanmaktadır (Aguilar-Toala vd., 2018;

Konstantinov vd., 2013). Dolayısıyla, postbiyotikler, aktif mikroorganizmaların gücünü artırmanın veya onları işlevsel bileşenlere dönüştürmenin önemli bir alternatifi olarak dikkat çekmektedir (Deshpande vd., 2018; Kataria vd., 2009).

### 1.5.1. Ekzopolisakkaritler

Mikroorganizmalar, hücre duvarlarına zayıf bağlarla bağlı olabilen ya da tamamen hücre dışında üretilen ve ekzopolisakkarit (EPS) adı verilen karmaşık biyopolimerler üretebilmektedirler. Bu biyopolimerler, kimyasal yapıları bakımından oldukça çeşitli olup farklı monosakkaritlerden oluşabilmektedir. Homopolisakkaritler (HoPS), tek bir monosakkarit türünden oluşan tekrarlayan birimlere sahip EPS'ler olarak tanımlanırken, heteropolisakkaritler (HePS) iki veya daha fazla şeker türünden oluşan tekrarlayan birimlere sahip EPS'leri temsil etmektedir (Zeidan vd., 2017). Ekzopolisakkaritlerin sağlık üzerinde birçok önemli etkisi olduğu farklı çalışmalarda belirtilmektedir (Das vd., 2014; Hongpattarakere vd., 2012). Özellikle, bağışıklık sistemi ile etkileşime girerek immun modülatör etki sergileyebilmektedirler. Dendritik hücreler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerini aktive ederek antijen sunumunu teşvik edebilmektedirler. Bu durum T hücreleri ve doğal katil hücreleri gibi bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve bu hücrelerin çoğalmasını sağlamaktadır (Makino vd., 2016). Örneğin, tofudan izole edilen *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen EPS'nin, nitrik oksit (NO) salgılanmasını indüklediği, makrofajların fagositik potansiyelini ve bağırsak mukozasında IgA üretilmesini ve salgılanmasını arttırdığı, lenfosit proliferasyonunu ise uyardığı rapor edilmiştir (Wang vd., 2018). Bir başka çalışmada ise, *Lactobacillus casei*'den elde edilen bir EPS'nin adjuvan olarak kullanıldığında şap hastalığı aşısının etkinliğini arttırdığı belirtilmiştir (Xiu vd., 2018). *Lactobacillus helveticus*'tan elde edilen bir EPS'nin ise, demir iyonlarını bağlama yeteneği sayesinde antioksidan potansiyeli ortaya konmuştur (Li vd., 2014). Ekzopolisakkaritler ayrıca lipid metabolizması üzerinde de olumlu bir etki sağlayarak kolesterol emilimini engelleyebilmektedir (Khalil vd., 2018). Örneğin, *Lactobacillus kefiranofaciens* tarafından üretilen kefiran adlı bir EPS'nin tüketimi, klinik öncesi bir hayvan modelinde (tavşan) ateroskleroz gelişimini geciktirmiştir (Uchida vd., 2010). Kefiran ayrıca, aşırı kolesterol tüketen sıçanlarda kan basıncının artışlarını önlemiş ve kan şekeri seviyelerini stabil hale getirmiştir (Maeda vd., 2004). Bu nedenle, kefiran gibi EPS'ler, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için potansiyel birer aday olarak değerlendirilmektedir.  $\beta$ -glukanlar ise faydalı bakterilerin bağırsak epiteline tutunmasını kolaylaştırarak probiyotiklerin etkinliğini artırabilmekte (Garai-Ibabe vd., 2010), gastrointestinal sistemdeki karotenoidlerin

(antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip bileşikler) emilimini ve biyoyararlanımını indükleyebilmektedir (Morifuji vd., 2020).

### 1.5.2. Enzimler

Mikroorganizmalar, lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi hücrenel bileşenleri reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerine karşı koruyan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar arasında glutasyon peroksidaz, peroksit dismutaz, katalaz ve NADH-oksidadz gibi antioksidan enzimler önemli bir rol oynamaktadır. *Lactobacillus plantarum*'dan elde edilen postbiyotiklerin antioksidan özelliklerinin, serumdaki artan glutasyon peroksidaz konsantrasyonu ile ilişkilendirildiği gözlemlenmiştir (Izuddin vd., 2020). Ayrıca, peroksit dismutaz veya katalaz sentezleyen genetiği değiştirilmiş *Lactobacillus* spp. suşlarının, Crohn hastalığının bir fare modelinde semptomları hafifletmede üstünlük gösterdiği tespit edilmiştir (LeBlanc vd., 2011). Artan katalaz aktivitesine sahip *Lactobacillus* spp. suşlarının ise inflamatuvar bağırsak hastalığının bir fare modelinde inflamasyonu daha etkili bir şekilde hafiflettiği görülmüştür (Tomusiak-Plebanek vd., 2018). Bununla birlikte, katalaz ifade eden genetiği değiştirilmiş *Lactobacillus lactis* suşunun farelerde kimyasal olarak indüklenen kolon kanserini önlediği tespit edilmiştir (De Moreno De Le Blanc vd., 2008). Mevcut çalışmalar, *Lactobacillus* spp. suşlarının anti-inflamatuar aktivitesinin, antioksidatif enzim profiline bağlı olduğunu göstermektedir.

### 1.5.3. Hücre Duvarı Fragmentleri

İmmün sistemi uyarıcı etkileri olduğu gösterilmiş olmasına rağmen lipoteikoik asitin aktivitesi hakkındaki veriler halen net değildir (Geun Kim vd., 2008). Bazı araştırmalar, lipoteikoik asidin IL-12 üretimini azalttığını ve immün düzenleyici sitokinlerin (örneğin IL-10) üretimini artırdığını öne sürmektedir (Kaji vd., 2010). Ancak, bunun aksini gösteren diğer çalışmalar lipoteikoik asitin inflamatuvar süreçleri hafifletmediğini ve hatta bağırsaktaki dokulara zarar verebileceğini göstermektedir (Zadeh vd., 2012). Özellikle, *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. cinslerine ait bakteriler tarafından üretilen lipoteikoik asit, deri mast hücrelerinin bazı bakteriyel ve viral enfeksiyonlara tepkisini uyarabilmektedir (Wang vd., 2012). Bu bulgular, lipoteikoik asidin potansiyel olarak çeşitli deri enfeksiyonlarının tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu olumlu etkilere rağmen, lipoteikoik asitin canlı organizmalarda yan etkilere ve aşırı inflamatuvar tepkilere yol açabileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir.

#### 1.5.4. Kısa Zincirli Yağ Asitleri

Bağırsak mikrobiyotasının temel son ürünleri kısa zincirli yağ asitleridir (KZYA). Birincil üretilen kısa zincirli yağ asitleri arasında asetat, propiyonat ve bütirat bulunmaktadır (Scheppach, 1994). Propiyonat, karaciğer tarafından metabolize edilerek glukoneogenez için ana substrat olarak kullanılırken, bütirat kolonositler tarafından emilerek birincil enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple insan periferik dolaşımında saptanabilen en bol KZYA asetat olarak tanımlanmaktadır (DenBesten vd., 2013; Koh vd., 2016). KZYA'lar, G-protein bağlı reseptörleri ve glukagon benzeri peptid 1'in (GLP-1) salgılanmasını uyarak enerji yönetimini etkileyebilmektedir. Bu etki, artan asetat miktarının insülin duyarlılığında bir artışa sebep olmasına ve vücut yağında azalmaya neden olabileceği şeklinde görünmektedir (Aoki vd., 2017). Asetat, merkezi sinir sistemini de etkileyerek iştahı doğrudan düzenleyebilmektedir. Bu durum, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde potansiyel bir uygulamaya işaret etmektedir (Frost vd., 2014). Asetat bakımından zengin bir diyetin kullanılması, farelerde enterohemorajik *Escherichia coli* O157:H7 enfeksiyonuna karşı direnci önemli ölçüde arttırmıştır. Bu etki muhtemelen asetatın bağırsak bariyerindeki sızdırmazlık özelliğinden kaynaklanmaktadır. Bu da toksinlerin genel dolaşıma girmesini önlemektedir (Fukuda vd., 2012).

Bütirat, enterositler için önemli bir enerji kaynağı olup bağırsak epitelinin yenilenmesine yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte, bütirat aynı zamanda immunsupresif etkiler de sergilemektedir (Lee vd., 2017). Örneğin, bütiratın, immunsupresif sitokinlerin (tip 1 interferonlar, IL-10, TGF- $\beta$ ) ifadesini artırarak ve çeşitli sitokinleri ve proinflamatuvar reseptörleri aşağı regüle ederek gıda toleransını indüklediği gösterilmiştir. Buna ek olarak, bütiratın rektal uygulanması, ülseratif kolitli hastaların kalın bağırsağında plasebo alan hastalara göre inflamatuvar değişikliklerde anlamlı bir gerileme sağladığı ortaya konulmuştur (Lührs vd., 2002). Propiyonat, karaciğerde glukoneogenezin ana bileşenlerinden biri olan bir KZYA'dır. Karbonhidrat metabolizmasındaki rolünün yanı sıra, propiyonat aynı zamanda kolesterol sentez yolunu inhibe eden bir etki de sergilemektedir (Bush, 1971). Propiyonat ayrıca, bütiratın anti-inflamatuvar etkisine benzer bir aktivite de göstermektedir (Tedelind vd., 2007). Kısa zincirli yağ asitlerinin tıpta terapötik kullanımı ise halen araştırma konusudur.

#### 1.5.5. Diğer Metabolitler

Bağırsak mikrobiyotası vitaminler, fenolik türevli metabolitler ve aromatik aminoasitler dahil olmak üzere bir dizi molekül üretebilmektedir. Yüksek biyoyararlanım,

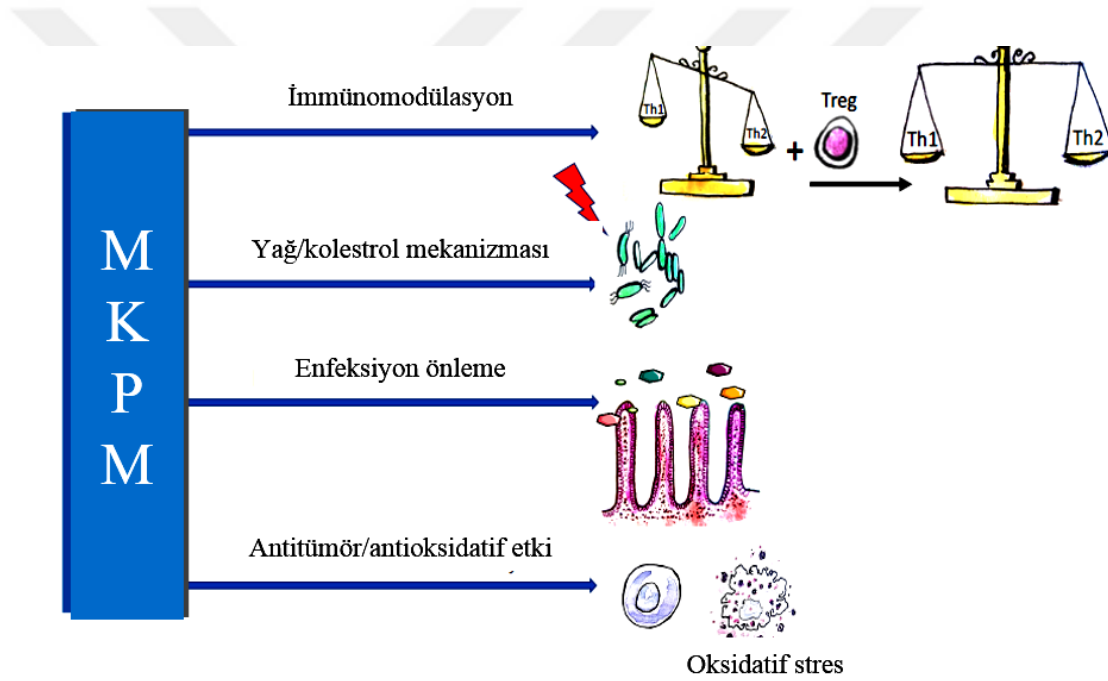
antioksidatif özellikler ve sinyal yollarına dahil olma özellikleri nedeniyle bu maddelerin konakçı ve mikrobiyota arasında önemli katkıları olduğu düşünülmektedir. Bazı mikrobiyota üyelerinin B12 vitaminini de novo sentezleyebildiği gösterilmiştir (Vogel vd., 2011). Örneğin, *Lactobacillus acidophilus*'un eklendiği yoğurt ürününün tüketimi, B12 vitamini ve folat serum seviyelerinde belirgin bir artışla ilişkilendirilmiş ve anemi prevalansında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Mohammed vd., 2006). Bağırsak mikrobiyotasının aromatik amino asitlerin (AAA) metabolizmasında da aktif rol oynadığı düşünülmektedir. AAA olarak bilinen bu biyoaktif moleküller, böbreklerden beyine ve kardiyovasküler sisteme kadar uzak organlar üzerinde etkili olabilmektedir (Liu vd., 2020). Örneğin, bağırsak mikrobiyotasının genetik modifikasyonu, plazma seviyelerindeki indoksil sülfatı kontrol altına alabilmektedir. İndoksil sülfat, kronik böbrek hastalığının ilerlemesine sebep olabilmekte, bu da böbrek bozukluklarında AAA metabolizmasını hedeflemenin olası bir rolü olduğunu öne sürmektedir (Devlin vd., 2016).

Polifenoller, bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilen ve önemli metabolit sentezine neden olan önemli bileşiklerdir. Bu etkileşim, konakçının uygulanan diyet programına verdiği yanıtta farklılıklar gösterebilmesine neden olmakta ve “metabotiplendirme” ile “kişiyeye özel beslenme” stratejilerinin oluşturulmasının önünü açmaktadır (Cortes-Martin vd., 2020; Espin vd., 2017). Diyet polifenollerinden türetilen postbiyotikler arasında ürolitin A (UA), equol ve 8-prenilnaringenin (8-PN) bulunmaktadır. Farelerde 10 haftalık UA tedavisi, kontrol grubundakilere göre %23,5 daha az ağırlık artışı göstermiştir. UA'nın anti-obezite etkilerinin yanı sıra, insülin direnci skorunu da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde iyileştirdiği bulunmuştur (Xia vd., 2020). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, UA'nın oral uygulanmasının, yağ asidi oksidasyon oranında, sistemik mitokondriyal sağlıkta ve serum açlık karnitin konsantrasyonunda iyileşmeye yol açtığı gösterilmiştir (Andreux vd., 2019). Orta yaşlı Japon kadınlarda bir yıllık equol takviyesinin arteriyel sertlikte azalmaya ve lipit parametrelerinde (HDL, LDL ve toplam kolesterol konsantrasyonları) artışa neden olduğu belirlenmiştir (Yoshikata vd., 2018). Ayrıca, menopoz sonrası kadınlarda bir yıllık equol alımının tüm vücut kemik mineral yoğunluğunda önemli bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Tousen vd., 2011).

## **1.6. Postbiyotiklerin Genel Etki Mekanizmaları**

Postbiyotiklerin karmaşık etkilerini bütünüyle anlamak için halen çalışmalar devam etmektedir. Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler,

postbiyotiklerin insan vücudunda pleiotropik bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Postbiyotiklerin etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaların, konakçı ve postbiyotik arasındaki etkileşim aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Postbiyotiklerin genel etki mekanizmaları Şekil 1.4'te özetlenmiştir. İmmün modülasyon bu etki mekanizmalarının başında yer almaktadır (Gosalbez ve Ramon, 2015). Bağırsak mikrobiyotasının immün modülatör etkileri uzun süredir araştırılmaktadır (Chung vd., 2012). T düzenleyici lenfositlerin farklılaşmasının indüklenmesi ve anti-inflamatuar sitokinlerin sentezi nedeniyle postbiyotikler, Th1 ve Th2 lenfositleri tarafından temsil edilen iki ana bağışıklık sistemi kolu arasındaki dengenin korunmasında rol almaktadır. Th1 ve Th2 lenfositleri arasındaki denge immün regülasyon için hayati öneme sahip olup bu dengenin bozulması, atopik bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık sistemi hastalıklarına neden olabilmektedir.



**Şekil 1. 4.** Postbiyotiklerin genel etki mekanizmaları (MKPM: Mikrobiyota kaynaklı postbiyotik mediatörler)

Bütiratın bağırsaktaki düzenleyici T hücrelerinin (Tregs) farklılaşmasını indüklediği bilinmektedir (Furusawa vd., 2013). Bununla beraber, propiyonat periferik Treg'lerin oluşumunu arttırmaktadır (Arpaia vd., 2013). *Bacillus coagulans* bakterisinden elde edilen çeşitli postbiyotik fraksiyonları (süpernatant, hücre duvarı fragmanları vb.) anti-inflamatuar sitokin üretimini indüklemiş ve T yardımcı bağımlı immün yanıtları teşvik etmiştir (Jensen vd., 2010). Bir başka çalışmada, *Bifidobacterium breve* bakterisinden elde edilen

süpernatantın, dentritik hücrelerin olgunlaşmasını ve hayatta kalmasını indüklediği, IL-10 salgılanmasını arttırdığı ve TNF- $\alpha$  salgılanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Hoarau vd., 2008).

Postbiyotiklerin bir diğer etkisi yağ ve kolesterol mekanizması üzerinedir. Obez bir fare modelinde yapılan çalışmalar, *Lactobacillus* spp. türlerinin trigliserit ve LDL kolesterol düzeylerini azaltırken faydalı HDL kolesterol düzeyini arttırdığını göstermiştir. Bu faydalı etki, *Lactobacillus* spp. türlerinin lipitler üzerinde olumlu etkileri olan bir reseptör olarak tanımlanan peroksizom proliferatörüyle aktifleştirilen reseptör (PPAR $\alpha$ ) aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Nakamura vd., 2016). Ayrıca, propiyonatın kolesterol öncüllerinin birikmesini önleyerek statin benzeri etkilere neden olabileceği de gösterilmiştir (Bush ve Milligan, 1971). Bununla beraber, insan kolonik hücrelerinde yapılan *in vivo* bir çalışma, propiyonatın peptid YY ve GLP-1 salınımını uyararak toplam yağ içeriğinde ve intrahepatoselüler lipid içeriğinde önemli bir azalma sağladığını ortaya koymuştur (Chambers vd., 2015).

Postbiyotiklerin çeşitli antimikrobiyal etkilere sahip olabilecekleri de belirtilmektedir. Örneğin, bazı postbiyotikler bağırsak bariyerini kapatma, patojenik bakterilerin gerekli reseptörlere rekabetçi bir şekilde bağlanma veya konakçı gen ekspresyonunu değiştirme yoluyla doğrudan anti-mikrobiyal etkilere sahip olabilmektedirler (Khodaii vd., 2017). Postbiyotiklerin probiyotiklerle birlikte kullanılması, klinik çalışmalarda rotavirüsle ilişkili ishalin etkili bir şekilde önlenmesine katkıda bulunmuştur (Rigo-Adrover vd., 2019). Ayrıca, 12-48 aylık bir grup çocukta yürütülen randomize klinik çalışmalar, *Lactobacillus paracasei* postbiyotiklerini içeren ürünlerin günlük alımının ishal, akut gastroenterit, farenjit, larenjit ve soluk borusu iltihabı vakalarında azalmaya yol açtığını göstermiştir (Corsellovd., 2017; Malagon-Rojas vd., 2020; Nocerino vd., 2015). Bununla beraber, en yaygın probiyotik türlerinden biri olan *Lactobacillus rhamnosus* GG'den elde edilen postbiyotiklerin, insan bağırsak düz kas hücrelerinin hasardan korunmasına yardımcı olduğu bulunmuştur (Cicenia vd., 2016).

İnflamasyon ile karsinogenez arasındaki sıkı ilişki postbiyotiklerin kanser alanında da kullanımını mümkün kılmaktadır. Kısa zincirli yağ asitlerinden biri olan propiyonat (*Propionibacterium freudenreichii* tarafından üretilen) apoptozu seçici olarak indüklemeye yeteneği sergilemiş olup ve mide kanseri hücrelerine karşı anti-kanser etki göstermiştir (Cousin vd., 2012). Kısa zincirli yağ asitleri ayrıca epigenetik modifikasyonlar yoluyla

onkogenlerin ve baskılayıcı genlerin düzenlenmesini de etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* GG postbiyotiklerinin, ZO-1 ekspresyonunu (hücreler arasındaki sıkı bağlantıların ve hücre yapışmasının doğru yapısından sorumludur) arttırdığı ve hücreler arası matrisin bozulmasına yardımcı olup, kanser hücresi penetrasyonunu kolaylaştıran MMP-9 ifadesini azalttığı tespit edilmiştir (Escamilla vd., 2012). Hücre içi reseptörlerden biri olan NOD1 ise bakteriyel peptidoglikanı tespit ederek otofajiyi ve inflamatuvar yanıt oluşturulmasını uyarmaktadır (Irving vd., 2014). *Lactobacillus fermentum*'dan elde edilen postbiyotikler, hepatoselüler kanser hücreleri olan HepG2'de otofajiyi indüklemiştir (Dinic vd., 2017).

## **1.7. Kemik Sağlığı ve Hastalıklarında Postbiyotiklerin Rolü**

Mikrobiyotadan türetilen metabolitler ile kemik sağlığı arasındaki karmaşık ve dinamik etkileşim, bunların iskelet sağlığının karmaşık dünyasında hem fizyolojik hem de patolojik rollerini açıklayan büyüleyici bir araştırma alanını ortaya çıkarmaktadır. İnsan mikrobiyotasının metabolik aktivitesinin yan ürünleri olan bu metabolitler, kemik sağlığının şekillenmesinde önemli bir rol oynamakta, homeostazisin korunmasına ve kemikle ilgili bozuklukların gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, osteojenik farklılaşma, kondrojenez, kemik üretimi ve emilim süreçlerini etkilemektedirler (Han vd., 2024). Bu metabolitlerin değiştirilmesi, kas-iskelet sistemi sağlığını artırmaya, kemik bozukluklarını hafifletmeye ve iskelet sağlığına yaklaşımımızı yeniden tanımlamaya yönelik ileriye dönük terapötik müdahaleler için potansiyel sergilemektedir.

### **1.7.1. Postbiyotikler ile Mineral Emilimi Arasındaki İlişki**

Son çalışmalar, gastrointestinal sistemdeki mineral emilim sürecini modüle etmede postbiyotiklerin hayati önemine ışık tutmakta ve kemik sağlığı ile homeostazinin korunmasını etkilemektedir (Duffuler vd., 2024). Bağırsak mikrobiyotası, mikro besinlerin emilimini ve optimal kemik sağlığını korumak için hayati önem taşıyan vitaminlerin sentezini etkileyebilmektedir.

Kalsiyum, kemik homeostazisinin korunmasında önemli bir rol oynayan temel bir besindir (Palacios, 2006). İnsan vücudundaki toplam kalsiyum içeriğinin yaklaşık %99'u esas olarak iskelet sisteminde yoğunlaşmıştır. Kalsiyum eksikliği ise önemli kemik demineralizasyonu ile ilişkilendirilmekte ve osteoporozun başlangıcını katalize etmektedir (Hegsted, 1986). Bağırsak mikrobiyotasının, KZYA'ları gibi belirli metabolitler üreterek

kalsiyumun emilimini kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Bağırsak lümeninde pH'nın düşürülmesi, gastrointestinal sistemdeki yüksek KZYA konsantrasyonunun etkilerinden biri olarak belirtilmektedir. pH'daki bu azalmanın, kalsiyum komplekslerinin, özellikle de kalsiyum fosfatın oluşumunu engellerken mineral çözünürlüğünü arttırdığı gösterilmiştir (Wallace vd., 2017). Bu nedenle, KZYA'ları kalsiyumun kullanılabilirliğini ve emilimini arttırdığı gösterilmiştir. Buna karşılık, KZYA'ların aynı zamanda bağırsak epiteli boyunca kalsiyumun hücre içi taşınmasını iyileştirme yeteneğine sahip olduğu da gözlemlenmiştir (Mibeo vd., 2001).

Bağırsak mikrobiyotası, optimal kemik sağlığını korumak için gerekli olan önemli bir vitamin olan K vitamininin sentezini etkileyebilmektedir (LeBlanc vd., 2013). K vitamininin, osteoblast farklılaşmasını kolaylaştırarak ve osteoklast farklılaşmasını inhibe ettiği ve kemik üretimini arttırdığı bulunmuştur (Hamidi vd., 2013). Bu senaryoda K vitamini, osteokalsin ve gama-karboksiglutamat proteini gibi kemik dokusuna özel önemli proteinlerin sentezinde bir kofaktör olarak görev yapmaktadır. Araştırma bulguları, alınan K vitamininin yaklaşık %50'sinin, Bacteroides de dahil olmak üzere bağırsak mikrobiyotamızın sentez faaliyetleri yoluyla üretildiğini göstermiştir (LeBlanc vd., 2013). B ve K vitaminleri de dahil olmak üzere önemli bir besin sağlayıcısı olan kolon, doğrudan veya dolaylı olarak kemik mineral yoğunluğunun gelişimini ve korunmasını etkileyebilmektedir (İbrahim vd., 2022). Kemik matriksi önemli miktarda kollajen olmayan bir protein olan osteokalsin içermektedir. K vitamini takviyesi olan bu proteine alternatif olarak kemik Gla proteini adı verilmektedir (Moser ve Eerden, 2019). Bu bileşenin karboksilasyonu, kemik minerallerine bağlanması için önemli kabul edilmektedir. K vitamini besin kaynaklarından elde edilebilse de bağırsak üretiminin vitamin tedarikine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu unutmamak hayati önem taşımaktadır. Bağırsak mikrobiyotası faydalı mikroorganizmaların sayısını düzenleyemezse, dolaşımdaki karboksillenmemiş osteokalsinin fazlalığı, K vitamini üretimindeki azalmadan kaynaklanabilmektedir. Kemik matriksinde karboksillenmiş osteokalsinin yokluğu, kemik dokusunun bozulmasına ve kırılmaya karşı duyarlılığın artmasına neden olabilmektedir (Dai ve Koh, 2015).

Özetle, postbiyotiklerin içerdikleri hayati minerallerin, özellikle de kalsiyum ve fosforun asimilasyonu üzerindeki etkisi, iskelet dengesinin ve genel iskelet sağlığının korunmasında çok önemli bir belirleyici oluşturmaktadır. Araştırmacılar, bu metabolitlerin mineral emilimini nasıl etkilediğini açıklığa kavuşturarak kemik yenilenmesini iyileştirmek,

kemik hastalıklarını hafifletmek ve genel kas-iskelet sistemi sağlığını geliştirmek için yeni stratejiler ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır.

### **1.7.2. Postbiyotikler ile Osteojenik Farklılaşma, Kondrogeniz, Kemik Oluşumu ve Emilimi Arasındaki İlişki**

Güncel çalışmalar, fizyolojik seviyelerde postbiyotik varlığının, kemik oluşumundan sorumlu olan osteoblastların özelliklerini ve davranışlarını potansiyel olarak geliştirebileceğini göstermektedir (Wallimann vd., 2021). Birçok çalışma, 500 nM ile 1 mM konsantrasyon aralığında bütiratın varlığının, fare kalvarial organ kültürlerinde alkalın fosfataz (ALP) üretiminde bir artışa yol açtığını göstermiştir (Schroeder ve Westendorf, 2005). Bütiratın MC3T3-E1 hücrelerinde Runx2'nin transkripsiyonunu desteklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca bütiratın osteoprotegerin (OPG) sentezini arttırdığı bulunmuştur. OPG olarak bilinen osteoklastojenez önleyici tuzak reseptörü, osteoklast gelişiminde önemli bir bileşen olan RANKL için bir bağlanma bölgesi olarak işlev görmektedir. OPG, RANKL ile etkileşimi yoluyla osteoklast aktivitesini azaltarak dolaylı olarak kemik oluşumunu arttırmaktadır (Katono vd., 2008). Önceki araştırmalar, sodyum bütiratın insan amniyotik membrandan izole edilen mezenkimal kök hücrelerde osteojenik özellikler sergilediğini göstermiştir (Fan vd., 2018). Fizyolojik seviyeleri aşan yüksek KZYA konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında, osteoblastlar fenotipiklerinde ve hayatta kalmalarında belirgin değişiklikler sergilemektedir. Bu değişiklikler, hücreyel canlılık üzerindeki zararlı etkilerle ilgili olan sitotoksisiteyi ve RANKL sentezindeki artışı içermektedir (Wallimann vd., 2021).

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma süreci ve ardından kallusun gelişimi, endokondral yol yoluyla kırıkların etkili iyileşmesinin başlatılmasında hayati bir rol oynamaktadır (Wallimann vd., 2021). Garrison vd. (1989) sodyum bütiratın kök hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisini incelemişler ve 0,03-1 mM aralığındaki bütirat konsantrasyonlarının kondrojenizi inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Paradis ve Hales (2013) valproatın farelerde kondrojeniz ve osteojenezin önemli düzenleyicileri olan Sox9 ve Runx2 ekspresyonunu azaltabildiğini göstermiştir. Aulthouse ve Hitt (1994) valproatın aynı zamanda insan kondrositlerinde kondrojenik belirteçlerin, özellikle tip II kollajen ve sülfatlanmış proteoglikanın üretiminde de azalmaya yol açtığını bulmuşlardır. Pirozzi vd. (2018) bütiratın, fare kondrositlerinde proinflatuar sitokinlerin üretimini azaltarak oldukça etkili inflammatuar sinyal yollarını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu inhibisyon, GPR43'ün aracılık ettiği bir yol aracılığıyla

gerçekleşmektedir. Ayrıca, bütiratın katabolik matriks metalloproteinazların sentezini kısıtlayabildiği ve eksplant kültüründe inflamasyon tarafından üretilen tip II kollajenin parçalanmasını azaltabildiği gösterilmiştir (Young vd., 2005). Bütiratın insan kondrositlerindeki anti-inflamatuar etkilerinin, NF- $\kappa$ B DNA bağlanma aktivitesiyle ilgisiz olduğu keşfedilmiştir (Chabane vd., 2008).

Kemik üretimi ve emilimi arasındaki ilişki, iskelet bütünlüğünün korunması için çok önemli olan dinamik ve oldukça düzenli bir mekanizmadır. Yapılan çalışmalar, postbiyotiklerin bu önemli sistemler üzerinde etki yaratmadaki büyüleyici işlevini ortaya çıkarmıştır. Araştırmalar, özellikle bütiratın, stromal hücrelerin osteojenik kökene doğru farklılaşmasını arttırmada ve mineralize nodüllerin oluşumunu kolaylaştırmada bir rolü olduğunu göstermiştir (Chen vd., 2007). Ayrıca, oligosakarit diyet takviyeleri kullanılarak KZYA üretiminin artırılması, BMD'deki artışla ilişkilendirilmiştir (Weaver vd., 2011). Buna karşılık, KZYA takviyesinin antibiyotiklerle tedavi edilen farelerde kemik hacmini azalttığı ancak kemik dönüşüm oranlarını etkilemediği gözlemlenmiştir (Yan vd., 2016). Deneysel kanıtlar, bütiratın kemik gelişimini tetikleme kapasitesinin, kemik iliğinde düzenleyici T hücrelerinin sayısındaki artışa bağlı olduğu fikrini desteklemektedir.

Mevcut araştırma sonuçlarından elde edilen veriler, KZYA'ların osteoklastogenez sürecini engelleyebileceğine işaret etmektedir (Wallimann vd., 2021). Sıçan kemik iliği kültürlerine 0,5 mM sodyum bütirat eklenmesi, osteoklast gelişiminde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Osteoblast gelişimini desteklemedeki rolüne ek olarak, sodyum bütiratın kemik iliği hücrelerine uygulanması TRAP pozitif çok çekirdekli hücrelerin üretimini azaltmıştır (Iwami ve Moriyama, 1993). Osteoklastların farklılaşması ve aktivasyonu, ligandı RANKL ile uyarılması üzerine RANK'ın aracılık ettiği sinyal yoluna bağlı olmaktadır. Rahman vd. (2003) NF- $\kappa$ B'ye bağlı transkripsiyonel aktivitenin, postbiyotiklerin dozuna bağlı olarak giderek baskılandığını belirtmiştir. Diğer bir çalışmada, bütiratın ve daha az ölçüde propiyonat uygulamasının osteoklastların büyümesini önleyen antiosteoklastik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Cantley vd., 2011). Osteoklast farklılaşmasının inhibisyonu, özellikle osteoklast farklılaşmasının ilk aşamalarında KZYA veya HDAC inhibitörleri uygulandığında etkili olmuştur (Lucas vd., 2018). Kemığın yeniden şekillenmesinin fizyolojik sürecinde kritik bir rol oynayan osteoklastlar, romatoid artrit ve periodontal hastalık gibi inflamatuvar durumlarda patolojik kemik kaybına neden olmaktadır. Ayrıca menopoz sonrası osteoporozda da rol oynayan bu hücrelerin postbiyotiklerce düzenlenmesi bu hastalıkların tedavisi için hedeflenen terapötik ajanların belirlenmesine yönelik yeni bir potansiyel yaklaşım sağlamaktadır.

### 1.7.3. Postbiyotikler ile Kemik Metabolizması Arasındaki İlişki

Kemik metabolizması ve bunun bağırsak mikrobiyotası ve bununla ilişkili metabolitler arasındaki karmaşık etkileşimi üzerine yapılan araştırmalara verilen önemde önemli bir artış söz konusudur. Bağırsaktan geçiş süreci sırasında, konjuge birincil safra asitleri, bağırsak mikrobiyotasında ayrılma ve dehidrojenasyon olaylarına maruz kalmaktadır (Chen vd., 2022). Deoksikolik asit ve litik safra asitleri dahil olmak üzere ikincil safra asitleri üretilmektedir (Singh vd., 2019). Safra asitlerinin kemik metabolizması üzerinde önemli bir etkisi araştırma konusu olmuştur. Menopoz sonrası kadınlardan oluşan bir grup üzerinde yürütülen bir çalışmanın bulguları, safra asitlerinin kan konsantrasyonları ile BMD arasında pozitif bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. *In vitro* deneylerden elde edilen bulgular, safra asitlerinin FXR sinyalini aktive ederek ve Runx2 ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek kemik metabolizmasını modüle edebildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, ikincil safra asitleri, çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan bir reseptör olan TGR5 yoluyla kemik sağlığı üzerinde kanıtlanmış etkileri olan bir hormon olan GLP-1'in üretimini teşvik ederek dolaylı olarak kemik metabolizmasını etkilemiştir (Sandoval ve D'Alessio, 2015).

Güçlü düzenleyici yeteneklerinden dolayı KZYA'lar, kemik metabolizması çalışmalarında büyük önem taşımaktadır (Zaiss vd., 2019). Lucas vd. (2018) KZYA'ların kemik homeostazisi üzerindeki doğrudan etkisini araştırmış ve osteoklast farklılaşmasının erken aşamalarında (24-48 saat) hücrel metabolizmayı oksidatif fosforilasyondan glikolize değiştiren preosteoklastların erken metabolik yeniden programlanmasının gerekli olduğunu göstermiştir. Osteoklast farklılaşması gibi çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesi, hücre metabolizmasından önemli ölçüde etkilenmektedir (Fellows vd., 2018). Bu farklılaşma süreci bir dizi ilerleyici metabolik değişikliği içermektedir. Osteoklastların öncü hücrelerden olgunlaşması oksidatif fosforilasyona bağlıyken, olgun osteoklastlar tarafından kemik emilimi süreci glikolize bağlıdır. Lucas vd. (2018) propiyonat/bütiratın uyarılmasının, 48 saat sonra osteoklast öncüllerinde glikolizde önemli bir artışa yol açtığını göstermiştir. Ancak oksidatif fosforilasyonda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular, propiyonat ve bütiratın osteoklast öncü hücrelerine uygulanmasının, osteoklast farklılaşmasının ilk aşamalarında metabolik süreçlerini değiştirdiğini ve glikolize doğru bir kaymaya yol açtığını kanıtlamıştır. Bu metabolik değişiklik hücrel strese neden olmakta ve sonuçta osteoklast farklılaşma sürecini engellemektedir.

#### 1.7.4. Postbiyotikler ile Kemik İyileşmesi Arasındaki İlişki

Postbiyotiklerin kemik onarımı süreci üzerindeki ana etkisine ilişkin araştırmalar son yıllarda hız kazanmaya başlamıştır. Kemik iyileşmesi olgusu, sürekli yaralanma veya kırık olan kemiklerdeki yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün restorasyonunu içeren karmaşık ve oldukça düzenlenmiş bir biyolojik süreçtir. Son çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının ve bununla ilişkili postbiyotiklerin, kemik onarımı süreci üzerinde hem doğrudan hem de dolaylı etkiler gösterebileceğini ortaya çıkarmıştır. Postbiyotiklerin konakçı üzerindeki etkisi, kırık iyileşme sürecini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bu potansiyel etki, vücudun bağışıklık sistemi üzerindeki dolaylı etkilerine bağlanabilmektedir. Ayrıca, sistemik olarak verilen probiyotikler, kemik iliğinde önemli konsantrasyonlara ulaşarak kırık iyileşme sürecinde yer alan hücreleri doğrudan etkileyebilmektedir (Wallimann vd., 2021).

Bağırsak mikrobiyotası, diyetli liflerin fermentasyonu yoluyla başta KZYA'ları olmak üzere birçok metabolit üretmektedir. Bu metabolitler ise kemik sağlığının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Mikrobiyota üyeleri tarafından üretilen ve postbiyotiklerin temel içeriklerinden biri olan KZYA'lar, çeşitli hücrel süreçleri ve moleküler mekanizmaları modüle ederek kemik kırığı iyileşmesinde çok önemli roller sergilemektedir. Bunların başında hematoma oluşumu ve fibrin pıhtılaşması gelmektedir. G proteinine bağlı reseptörler (GPR41 ve GPR43) aracılığıyla etki eden KZYA'lar, endotel hücrelerinde doku plazminojen aktivatörü ekspresyonunu indüklemektedir. Bu indüksiyon fibrinolizi arttırmakta, fibrin pıhtılarının parçalanmasını teşvik ederek kemik iyileşmesinin sonraki aşamaları için gerekli olan hematoma çözülmesini kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, KZYA'lar apoptoz ve sitostazi modüle ederek fibroblast davranışını düzenlemektedir. Kırık iyileşmesinin erken aşamalarında granülasyon dokusunun oluşumunu ve yara kapanmasını kolaylaştırarak fibroblast çoğalmasını ve göçünü teşvik etmektedirler. Osteojenik farklılaşma ve osteoklast fonksiyonunun modülasyonunda önemli görevler sergilemektedirler. Histon deasetilaz (HDAC) düzenlemesi yoluyla ALP, Runx2 ve osteoprotegerin (OPG) ekspresyonunu teşvik ederek osteojenik farklılaşmayı etkilemektedirler. Ek olarak RANKL ekspresyonunun reseptör aktivatörünü baskılayarak osteoklast farklılaşmasını ve aktivitesini inhibe ederek kemik homeostazisini korumaktadırlar. Bununla birlikte, VEGF, PPAR $\gamma$  ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek anjiyogenezi desteklemektedirler. Bu sonuç, rapamisin (mTOR) yolunun hedefi ile etkileşimler neticesinde elde edilmekte olup iyileşen kırık bölgesine oksijen ve besin sağlamak için yeni kan damarlarının oluşumunu kolaylaştırmaktadır. İnflamatuar yanıt ve

bağıklık hücreleri düzenlemesi üzerindeki etkilerini, düzenleyici T hücreleri (Treg) farklılaşmasını teşvik ederek, antimikrobiyal aktiviteyi artırarak ve bir M2 makrofaj fenotipini indükleyerek inflamatuvar yanıtı modüle ederek gerçekleştirmektedirler. Tümör nekroz faktörü-alfa gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinleri ile HDAC aracılığıyla transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) üretimini düzenlemekte ve doku onarımını desteklemektedirler. Son olarak, 6GPR43 sinyali yoluyla proinflamatuvar sitokinler, Sox9, Runx2, kolajen tip II alfa 1 (COL2A1) ve küçük proteoglikanların ekspresyonunu modüle ederek kondrojenezini etkilemektedirler. Bu düzenleme, kırık iyileşmesi sırasında kemik oluşumu için şablon görevi gören kırık dokusunun oluşumunu desteklemektedir (Han vd., 2024).

Sonuç olarak, son yıllarda ortaya çıkan bu araştırma alanı, postbiyotiklerin kemiğin metabolik süreci üzerindeki derin etkisini vurgulayarak, kas-iskelet sağlığının iyileştirilmesi ve kemikle ilgili hastalıkların tedavisi için yenilikçi terapötik müdahalelere ve stratejilere kapı açmaktadır. Kemik hastalıkları ve sağlığı açısından postbiyotiklerin incelenmesi, kas-iskelet sistemi tıbbi alanında gelecekteki araştırma ve ilerlemeler için çeşitli potansiyel fırsatlara sahip yeni bir çalışma alanı olarak dikkat çekmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasının temel amacı, kedi (tekir) fekal mikrobiyotası kaynaklı *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 ve köpek (kangal) süt mikrobiyotası kaynaklı *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşlarına ait postbiyotiklerin veteriner hekimlikte karşılaşılan kemik dejenerasyonuna yönelik potansiyel etkilerini ticari bir yapı iskelesine entegrasyonları neticesinde *in vivo* koşullar altında değerlendirmektir. Çalışmadan elde edilecek sonuçlarla meydana gelen kemik dejenerasyonlarının iyileşme sürelerinin azaltılması hedeflenmektedir.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

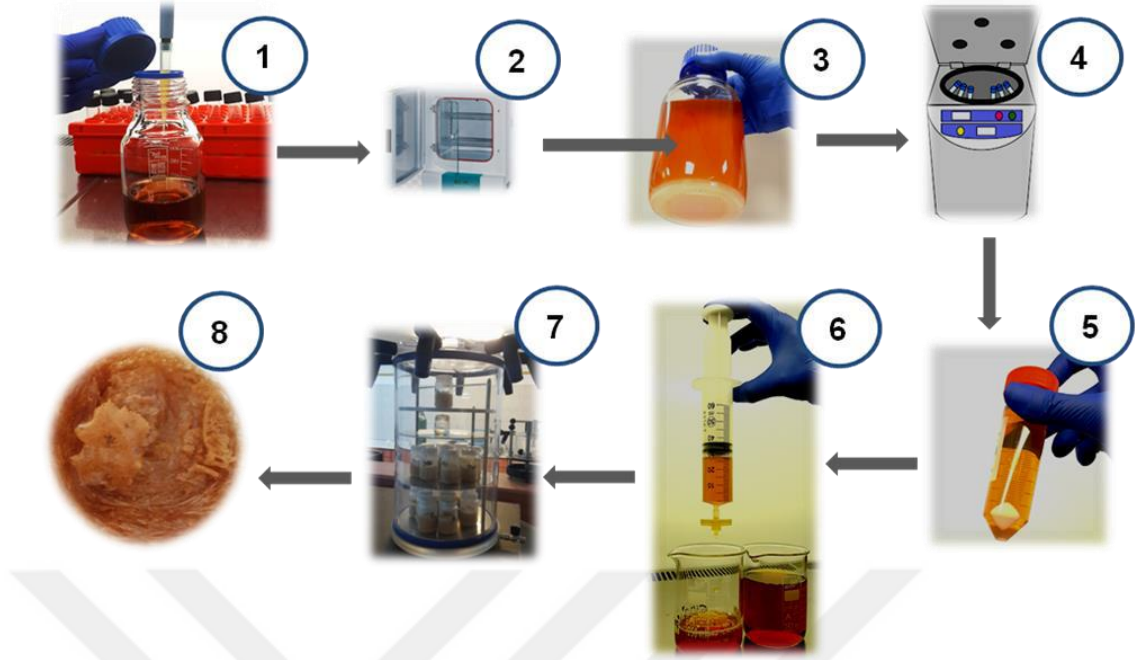
### 2.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Bakteriler

Postbiyotik kaynağı olarak; Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) kültür koleksiyonundan temin edilen 2 farklı laktik asit bakteri (LAB) suşu kullanılmıştır. *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşu kedi (tekir, dişi, 4 yaş) fekal mikrobiyotası, *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 ise köpek (kangal, dişi, 2 yaş) süt mikrobiyotası kaynaklıdır. Her iki LAB suşuda MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, Merck, ABD) besiyerinde 37°C sıcaklık koşullarında kültüre edilmiştir.

Postbiyotik kaynağı olarak kullanılan bu bakteriler “EVCİL HAYVANLAR İÇİN YERLİ VE BİYOLOJİK GIDA TAKVİYELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE PROTOTİP ÜRETİMİ” başlıklı KOSGEB projesi (2018-2020) kapsamında izole edilmiş ve tanımlanmış olup aynı proje kapsamında probiyotik etkinlikleri kanıtlanmıştır.

### 2.2. Postbiyotiklerin Eldesi

Postbiyotiklerin eldesi amacıyla gliserol (%50) stokta derin dondurucuda saklanan bakteri stokları MRS sıvı besiyerine transfer edilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İkinci pasajı takiben bakteri saflıkları Gram boyama ve çizgi ekim yöntemleri ile kontrol edilmiştir. Kontaminasyon olmadığı doğrulanan kültürler postbiyotik eldesi için büyük hacim (200 ml) MRS besiyerine inoküle edilmiştir. 37°C’de 24 saat inkübasyonu takiben 15.000 rpm’de 20 dakika santrifüj (Nüve, Türkiye) işlemi gerçekleştirilmiş ve hücrelerinden ayrılan üst faz toplanarak 0,22 µm gözenek çapına sahip steril membran filtrelerden geçirilmiştir (Sartorius, Almanya). Postbiyotikleri içeren üst faz liyofilize edilerek ilerleyen aşamalarda kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir. Tüm bu aşamalar Şekil 2.1’de özetlenmiştir (OmerOglou, 2021).



**Şekil 2. 1.** Postbiyotik eldesinin temel aşamaları

(1. Saf kültürlerin 200 mL sıvı MRS besiyerine % 1 oranında inokülasyonu, 2. 37°C’de 24 saat inkübasyon, 3. Aktif kültürün eldesi, 4. 15.000 rpm’de 20 dakika santrifüj, 5. Pelletin ve postbiyotik içerikli üst fazın eldesi, 6. Postbiyotik içerikli üst fazın hücrelerinden arındırılmak üzere 0,22 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilmesi, 7. Liyofilizasyon işlemi [vakum basıncı: 0.120 mB-kondansör sıcaklığı -58°C (Christ freeze dryer, Almanya)], 8. Postbiyotik içerikli toz preparatın eldesi)

### 2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

*İn vivo* çalışmalara dahil edilecek postbiyotik dozunu belirlemek amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan temin edilen MC3T3-E1 (ATCC, CRL-2593™) fare preosteoblast hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (Biological Industries, ABD) ve %1 penisilin-streptomisin (Biological Industries, ABD) içeren alfa-MEM’de (Thermo Fisher Scientific, ABD), 37°C’de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda kültüre edilmiştir (Chen vd., 2020). Hücrelerin sayımı, tripan mavisi kullanılarak otomatik hücre sayım cihazında (TC-20, BioRad, ABD) gerçekleştirilmiştir.

Postbiyotiklerin hücreler üzerinde sitotoksik etki sergilemeyen dozunu belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) analizi gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 96 kuyulu mikropalakalara  $2 \times 10^4$  kuyu/hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. 37°C’de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saat inkübasyonu takiben besiyeri postbiyotiğin farklı dozlarını (50-2.000 µg/ml) içeren yeni bir besiyeri ile değiştirilmiş ve aynı koşullarda 24, 48 ve 72 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben, her

kuyucuğa 20 µl tetrazolyum boya (MTT, Sigma, ABD) solüsyonu (5 mg/ml) eklenmiş ve plakalar 37°C’de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ardından ortam aspire edilmiş ve kuyucuklara 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma, ABD) eklenmiştir. Kristaller tamamen çözüldükten sonra oluşan renk değişiminin optik dansite değerleri bir mikropilaka okuyucu (Epoch, ABD) kullanılarak 490 nm’de ölçülmüştür. Postbiyotik içermeyen kuyular kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışma üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

## **2.4. *In vivo* Çalışmalar**

### **2.4.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Deney Hayvanları ve Bakımı**

Deney hayvanlarının kullanım izni, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından **2021-13-107** karar numarası ile onaylanmıştır (Ek-1).

Tez çalışması kapsamında 64 (altmış dört) adet erkek Wistar rat (10 haftalık, 323-497 gr) kullanılmıştır. Deney hayvanları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı tarafından temin edilmiş olup tüm deneyler aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar oda ısısında (18-25°C’de) 12 saat karanlık-12 saat aydınlık uygulanan odalarda muhafaza edilmiş olup *ad-libitum* beslenmeye tabi tutulmuştur.

### **2.4.2. Deneysel Hayvan Grupları ve Uygulamalar**

64 adet erkek Wistar rat her grupta 16 adet hayvan olacak şekilde toplamda dört gruba ayrılmıştır. Etki büyüklüğü 0,5, tip-1 hata olasılığı 0,05, güç %90 ve grup sayısı 4 kriterleri kullanılarak araştırma düzeninin yeterli miktarda ancak minimum sayıda hayvan ile yürütülmesi için örneklem büyüklüğü belirlenmiştir. Yapılan güç analizi sonucunda her grup için 16 olmak üzere toplamda 64 hastanın çalışmada yer almasının gerektiği hesaplanmıştır.

Birinci gruptaki hayvanlarda (n=16) defekt oluşturulmuş ancak herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Dolayısıyla bu grup kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İkinci gruptaki hayvanlarda (n=16) oluşturulan defekt bölgesine yalnızca ticari olarak temin edilen yapı iskelesi (Gelfix Collagen Ped; uygulama alanlarına kolaylıkla uyum sağlayan süngerimsi ped şeklinde, liyofilize ve steril olup doğal heterolog tip 1 at kollajeninden oluşmaktadır) yerleştirilmiştir. Üçüncü gruptaki hayvanlarda (n=16) oluşturulan defekt bölgesine *in vitro*

çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre seçilen dozu içeren birinci postbiyotiğin (*Enterococcus faecium* EIR/CT-1 kaynaklı) entegre edildiği yapı iskelesi yerleştirilmiştir. Postbiyotikler, emdirme yöntemi ile ticari yapı iskelesine entegre edilmiştir. Dördüncü gruptaki hayvanlarda (n=16) oluşturulan defekt bölgesine ise *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre seçilen dozu içeren ikinci postbiyotiğin (*Enterococcus lactis* EIR/DG-1 kaynaklı) entegre edildiği yapı iskelesi yerleştirilmiştir. Uygulamaları takiben, tüm ratlar 45 gün süreyle gözlem altında tutulduktan sonra yüksek dozda anestezi verilerek ötenazi işlemi uygulanmıştır. Gözlem süresi sonunda tüm hayvanların ağırlıkları kontrol edilmiştir.

Defekt oluşturmak amacıyla opere edilen ratlara preoperatif antibiyotik olarak 25mg/kg dozda intraperitoneal enjeksiyonla sefazolin sodyum uygulanmıştır. Anestezi, 10 mg/kg ksilazin hidroklorür ve 60 mg/kg ketamin hidroklorür ile sağlanmıştır. Ratların kalvariumları tıraş edilerek operasyon masasına sternal pozisyonda başı sabit olacak şekilde konumlandırılmıştır. Hayvanlarda hipotermiyi önlemek için termal ped ve sıcak su torbası kullanılmıştır. Asepsi antisepsi kurallarına uyularak deride 2 cm uzunluğunda yapılan ensizyonu takiben deri altı bağ dokusu küt diseksiyonlarla ekarte edilmiştir. Kraniuma ulaşıldıktan sonra ratların her birinin kalvaryumunda punch biyopsi kalemi ile 6 mm çapında 1 adet kemik defekti oluşturulmuştur. Profilaktik amaçla deneklere 3-7 gün süreyle intraperitoneal 25 mg/kg sefazolin sodyum uygulanmıştır. Ayrıca post operatif analjezi için tüm hayvanlara 2 mg/kg dozda subkutan olarak tek doz butorphanol uygulanmıştır.

### **2.4.3. Histopatolojik Analizler**

Ötenazi işlemi sonrası uzaklaştırılan kalvaryum örnekleri 50 ml %10'luk tamponlu formalinde 20-25°C'de (oda sıcaklığı) 72 saat boyunca tespit edilmiş ve ardından Decal III (Atom Scientific, REF: RRDC3-E; LOT: 28967) solüsyonunda 48 saat bekletilerek dekalsifiye edilmiştir (Spicer vd., 2012). Dekalsifikasyon sonrası, defekt alanını içeren bölge kalvaryumdan ayrılarak defekt alanının bulunduğu dokular longitudinal şekilde kesilerek üç eşit parçaya ayrılmıştır. Rutin doku takibi cihazında (Epredia STP 120) tespit işlemi tamamlandıktan sonra parafine bloklanan (Epredia, HistoStar) dokulardan mikrotom (Epredia HM 355S) aracılığıyla 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler, standart Hematoksilen&Eozin (H&E) boyası ile otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL) boyanmış ve entellan ile kapatılmıştır. (Leica CV5030). Hazırlanan preparatlar kamera ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus BX51-DP71, Japonya) histopatolojik yönden

değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme, “0= Yok, 1= Hafif, 2= Orta ve 3= Şiddetli” derece olmak üzere semi-kantitatif şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### **2.4.4. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Analizleri**

Ötenazi işlemi sonrası uzaklaştırılan kalvaryum örnekleri Mikro Bilgisayarlı Tomografi (BT) ile filtre kullanılmadan incelenmiştir. Mikro BT için ratlardan alınan kemik bölgeleri serebral yüzeyi aşağı bakacak şekilde (prone pozisyonu) yerleştirilmiş ve seri taramalar gerçekleştirilmiştir (Sweeney, 1995). Taramaların her biri kemikler için tek tek yapılmış olup alınan her fotoğraf doğrulama amacıyla üç kez çekilmiş ve daha sonra tek fotoğraf haline getirerek oluşan kirlilik elimine edilmiştir. Sonuçlar, Mikro BT aracılığıyla kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

#### **2.4.5. Planar Radyografi Analizleri**

%70 etanolde saklanan doku örnekleri planar radyografi ile analiz edilmiştir. Solüsyondan çıkarılan örnekler serebral yüzey yukarı bakacak şekilde film kasetinin üzerine düz bir şekilde yerleştirilmiştir. Çekilen grafiler “Kemik Köprüleri ve Birleşme Derecesi İçin Puanlama Kılavuzu” kullanılarak skorlanmıştır (Patel vd., 2008). Bu skorlamaya göre; defekt içerisinde herhangi bir kemik oluşumu yoksa: 0 (sıfır) puan, defekt içerisinde dağınık halde birkaç kemik spikülü bulunuyorsa: 1 (bir) puan, yalnızca defekt sınırlarında kemik oluşumu/köprüleri varsa: 2 (iki) puan, defekt uzunluğunun bir kısmında kemik oluşumu/köprüleri varsa: 3 (üç) puan, tüm defekt aralığının en uzun olduğu kısımda (6 mm) kemik oluşumu/köprüsü varsa: 4 (dört) puan olarak değerlendirilmiştir.

### **2.5. İstatistiksel Analizler**

Verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler hesaplanarak “Aritmetik Ortalama  $\pm$  Standart Hata” ve/veya “Medyan (minimum-maksimum)” şeklinde ifade edilmiştir. Hipotez testlerine geçilmeden önce veriler parametrik test varsayımlarından normal dağılıma uygunluk yönünden Shapiro Wilk, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelenmiştir. Parametrik varsayımları sağlayan veriler için gruplar arası farklılığın önem kontrolü tek yönlü varyans analizi ile, parametrik test varsayımlarını sağlamayanlar için ise Kruskal Wallis testi ile incelenmiştir. İleri karşılaştırma testleri için Tukey ve Dunn Bonferroni testlerinden yararlanılmıştır. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde  $p < 0.05$  kriteri kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS 21 paket programından yararlanılmıştır.

## 3. BULGULAR

### 3.1. Postbiyotik Dozunun Seçimi

*In vivo* çalışmalara dahil edilecek postbiyotik dozunu belirlemek amacıyla hücre kültürü çalışmalarından elde edilen MTT analiz sonucu verileri değerlendirilmiştir. Buna göre, çalışmaya dahil edilen her iki postbiyotiğe ait tüm dozların 24. saat muameleyi takiben fare preosteoblast hücreleri üzerinde toksik etki sergilemediği gözlemlenmiştir. Bunun aksine, 48 saatlik muamele sonucunda 1.500 ve 2.000 µg/ml dozlarının fare preosteoblast hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar, 72. saat muameleyi takiben de belirlenmiştir (Şekil 3.1). Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, *in vivo* çalışmalar kapsamında kullanılacak yapı iskelesine entegre edilecek dozun her iki postbiyotik için de 100 µg/ml olmasına karar verilmiştir.

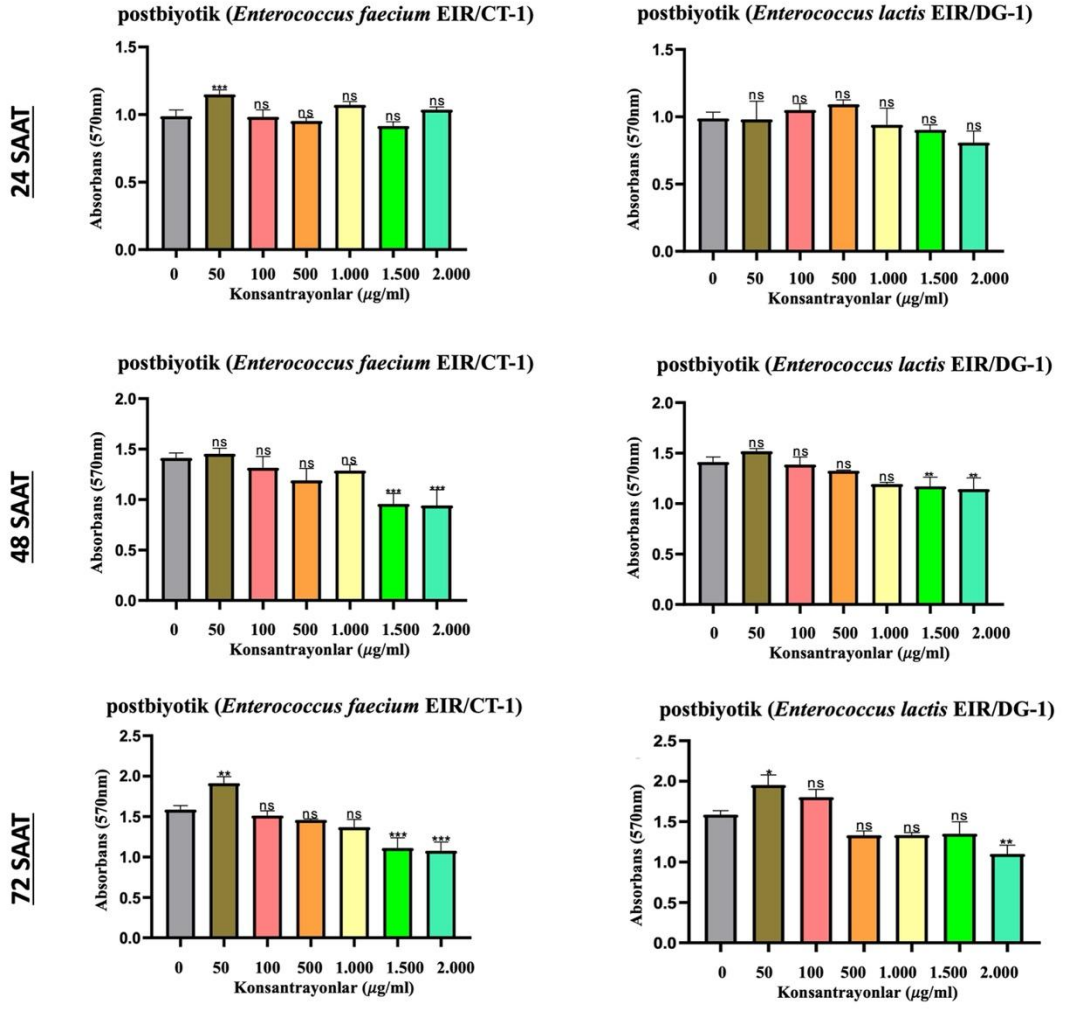
### 3.2. Postbiyotiklerin Rat Kalvaryumu Kritik Boyutlu Defekt Modelinde Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

Deneysel uygulamaları takiben grupların canlı ağırlıkları kontrol edilmiştir. Defekt bölgesi ise histopatolojik, mikro bilgisayarlı tomografi ve planar radyografi analizleri açısından değerlendirilmiştir.

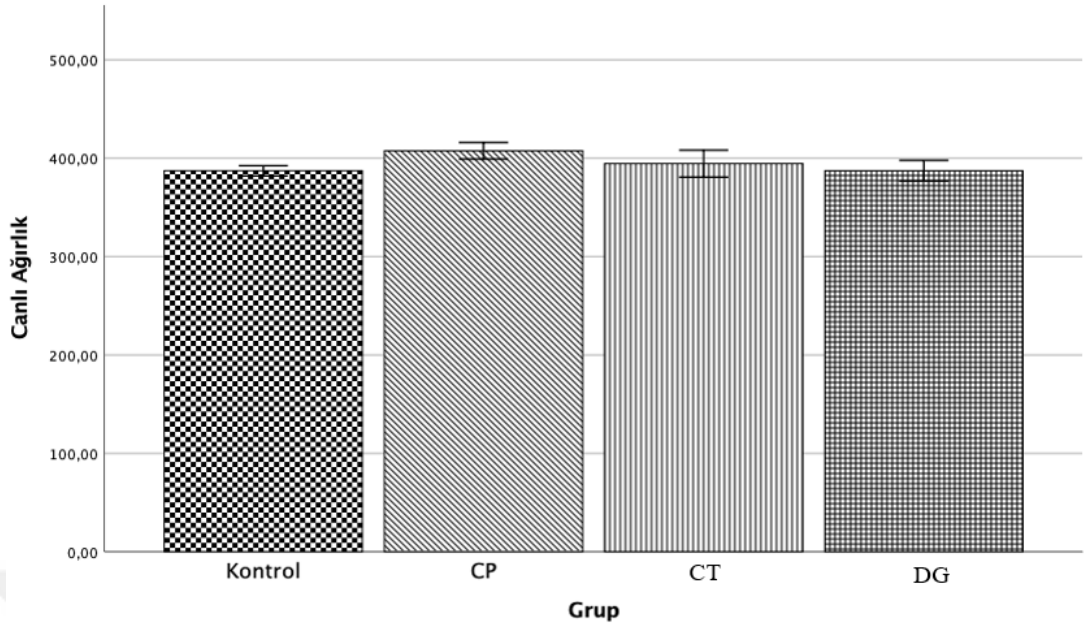
Kırk beş günlük gözlem sürecini takiben tüm gruplara ait hayvanların canlı ağırlıkları ölçülmüş olup, kontrol grubu ile kıyaslandığında diğer deneysel gruplarda yer alan hayvanların ağırlık ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 3.2, Çizelge 3.1).

#### 3.2.1. Histopatolojik Bulgular

Ötenazi işlemi sonrası uzaklaştırılan kalvaryum örnekleri fiksasyon işlemi takiben parçalara ayrılmış (Şekil 3.3) ve kasetleme işlemi takiben histopatolojik incelemeler amacıyla H&E boyamaya tabi tutulmuştur. H&E boyaması neticesinde elde edilen mikroskop görüntüleri (Şekil 3.4) yeni kemik oluşumu, fibröz doku oluşumu, kanama, yangı ve vaskülarizasyon açısından değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 1. Postbiyotiklerin fare preosteoblast hücre canlılığı üzerindeki etkileri

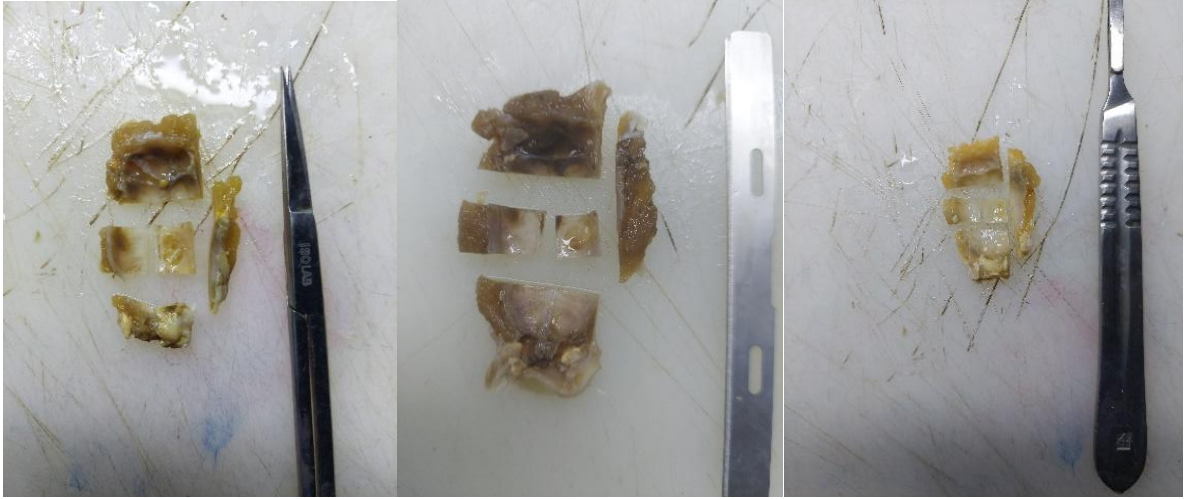


**Şekil 3. 2.** Grupların canlı ağırlık dağılımına ait grafik (Kontrol; sadece defekt oluşturulan grup, CP; defekt oluşturulan ve postbiyotiksiz ticari yapı iskelesi uygulanan grup, CT; defekt oluşturulan ve EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup, DG; defekt oluşturulan ve EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup)

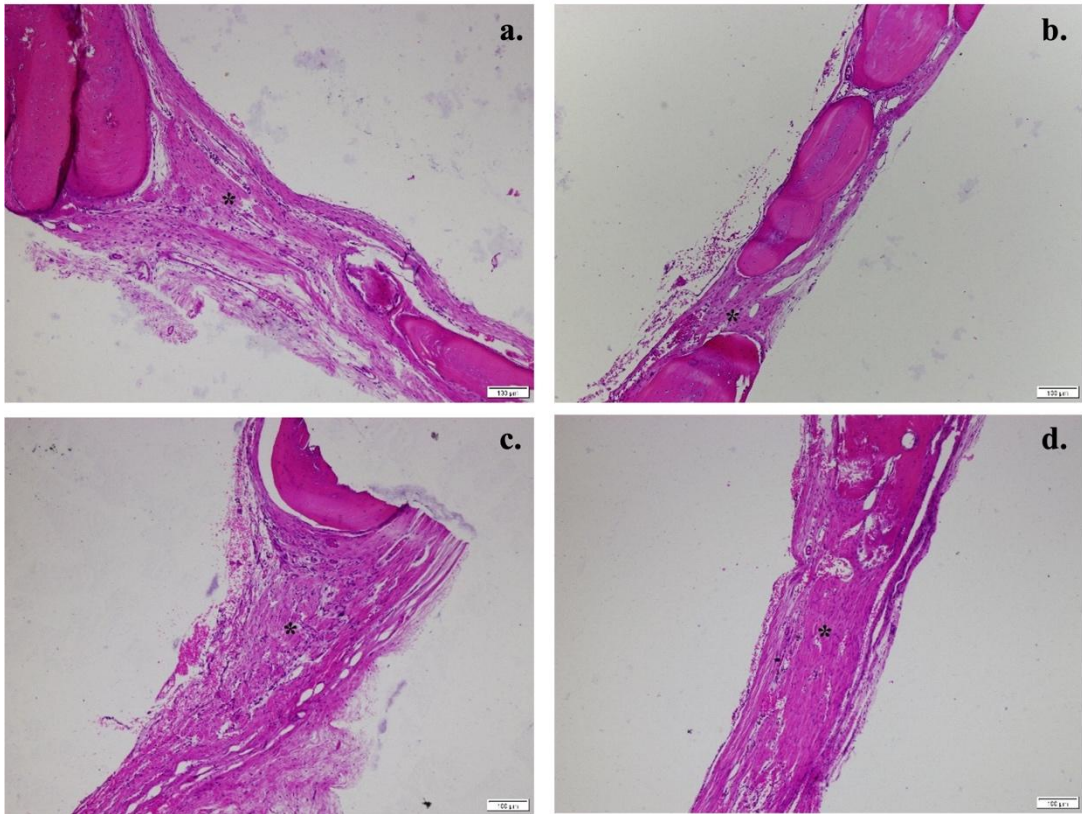
**Çizelge 3. 1.** Gruplarda yer alan hayvanların genel ağırlıkları (gr)

DENEK NUMARALARI	KONTROL GRUBU	CP GRUBU	CT GRUBU	DG GRUBU
1	369	387	387	356
2	372	375	324	336
3	427	381	333	383
4	385	398	405	376
5	440	411	463	345
6	365	440	410	353
7	380	390	436	497
8	385	333	455	379
9	380	425	427	402
10	390	421	436	447
11	377	403	379	409
12	370	449	343	409
13	402	453	323	340
14	389	383	323	409
15	375	406	373	374
16	388	464	493	380
<b>ORTALAMA</b>	<b>387,125</b>	<b>407,437</b>	<b>394,375</b>	<b>387,187</b>

(Kontrol; sadece defekt oluşturulan grup, CP; defekt oluşturulan ve postbiyotiksiz ticari yapı iskelesi uygulanan grup, CT; defekt oluşturulan ve EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup, DG; defekt oluşturulan ve EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup)



Şekil 3. 3. Kalvaryum örneklerinin genel kesit görüntüleri



Şekil 3. 4. Kalvaryum örneklerinin histopatolojik analizleri H&E boyaması (a; sadece defekt oluşturulan kontrol grubu, b; defekt oluşturulan ve postbiyotiksiz ticari yapı iskelesi uygulanan grup, c; defekt oluşturulan ve EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup, d; defekt oluşturulan ve ticari yapı iskelesi uygulanan grup, e; defekt oluşturulan ve EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup, \*;defekt bölgesindeki fibröz doku oluşumları)

Sonuçlar kontrol grubu (n=16) açısından değerlendirildiğinde, defekt bölgesinde çoğunlukla orta (n:7) veya şiddetli (n:7) derece kanama, orta derece fibröz doku oluşumu (n:8) ve vaskülarizasyon (n:10), hafif derece yeni kemik doku oluşumu (n:8) ve çoğunlukla lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları (n:13) dikkat çekmiştir. Ayrıca tüm örneklerde hemosiderin pigmenti varlığı gözlemlenmiştir. Birer örnekte mast hücrelerine ve osteoklastik dev hücrelerine de rastlanmıştır.

Sonuçlar defekt oluşturulan ve postbiyotiksiz ticari yapı iskelesi uygulanan grup açısından değerlendirildiğinde (n=15), defekt bölgesinde çoğunlukla orta derece fibröz doku oluşumu (n:8) ve vaskülarizasyon (n:8), hafif derece çoğunluğu lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları (n:13), yeni kemik doku oluşumu (n:8) ve kanama (n:7) tespit edilmiştir. Bununla birlikte çok sayıda örnekte hemosiderin pigmenti, mast hücreleri ve osteoklastik dev hücreleri gözlemlenmiştir.

Sonuçlar defekt oluşturulan ve *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup açısından değerlendirildiğinde (n=15), defekt bölgesinde çoğunlukla şiddetli derece kanama (n:10), orta derece fibröz doku oluşumu (n:10) ve vaskülarizasyon (n:11), hafif derece çoğunluğu lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları (n:10) ve yeni kemik doku oluşumu (n:8) dikkati çekmiştir. Ayrıca örneklerin çoğunda hemosiderin pigmenti, mast hücreleri ve çok çekirdekli dev hücreleri tespit edilmiştir.

Sonuçlar defekt oluşturulan ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup açısından değerlendirildiğinde (n=15), defekt bölgesinde çoğunlukla şiddetli derece kanama (n:9), orta derece fibröz doku oluşumu (n:8) ve vaskülarizasyon (n:12), çoğunluğu lenfosit ve makrofajlardan oluşan hafif derece mononükleer hücre infiltrasyonları (n:11) tespit edilmiştir. Birkaç örnekte hafif (n:5) ve/veya orta (n:3) derece yeni kemik doku oluşumuna rastlanmıştır. Ayrıca çok sayıda örnekte hemosiderin pigmenti, mast hücreleri ve çok çekirdekli dev hücreleri varlığı gözlemlenmiştir.

Histopatolojik analizler neticesinde her grupta yer alan rat kalvaryumları yeni kemik oluşumu açısından değerlendirilerek istatistiksel karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Medyan (Min.- Maks.) = 1 (0-2)], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 1 (0-2)], *Enterococcus*

*faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 1 (0-2)], ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 0,5 (0-2)] değerleri tespit edilmiştir. Ölçülen bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ( $p=0,751$ ).

Gruplarda bulunan kalvaryumlar incelendiğinde iyileşme dokusu olarak fibröz doku oluşumu bulunduğu da gözlemlenmiştir. Sadece defekt oluşturulan kontrol grubunda [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (1-3)], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grupta [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (1-2)], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grupta [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (2-3)] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grupta [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (1-3)] değerleri ölçülmüştür. Ölçülen bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise gruplar arasında çok yüksek derecede anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir ( $p=0,004$ ). Elde edilen sonuçlar, postbiyotik içeren yapı iskelelerinin kontrollere karşı fibröz doku oluşumunda daha etkili olduğunu göstermiştir.

Kalvaryumların histopatolojik incelemesi yapılırken travmanın doğru bir şekilde oluşturulup oluşturulmadığını görmek amacıyla kanama açısından da değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Buna göre sadece defekt oluşturulan kontrol grupta [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (1-3)], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grupta [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (1-3)], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grupta [Medyan (Min.- Maks.) = 3 (1-3)] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grupta [Medyan (Min.- Maks.) = 3 (1-3)] değerlerine ulaşılmıştır. Ölçülen bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ( $p=0,082$ ).

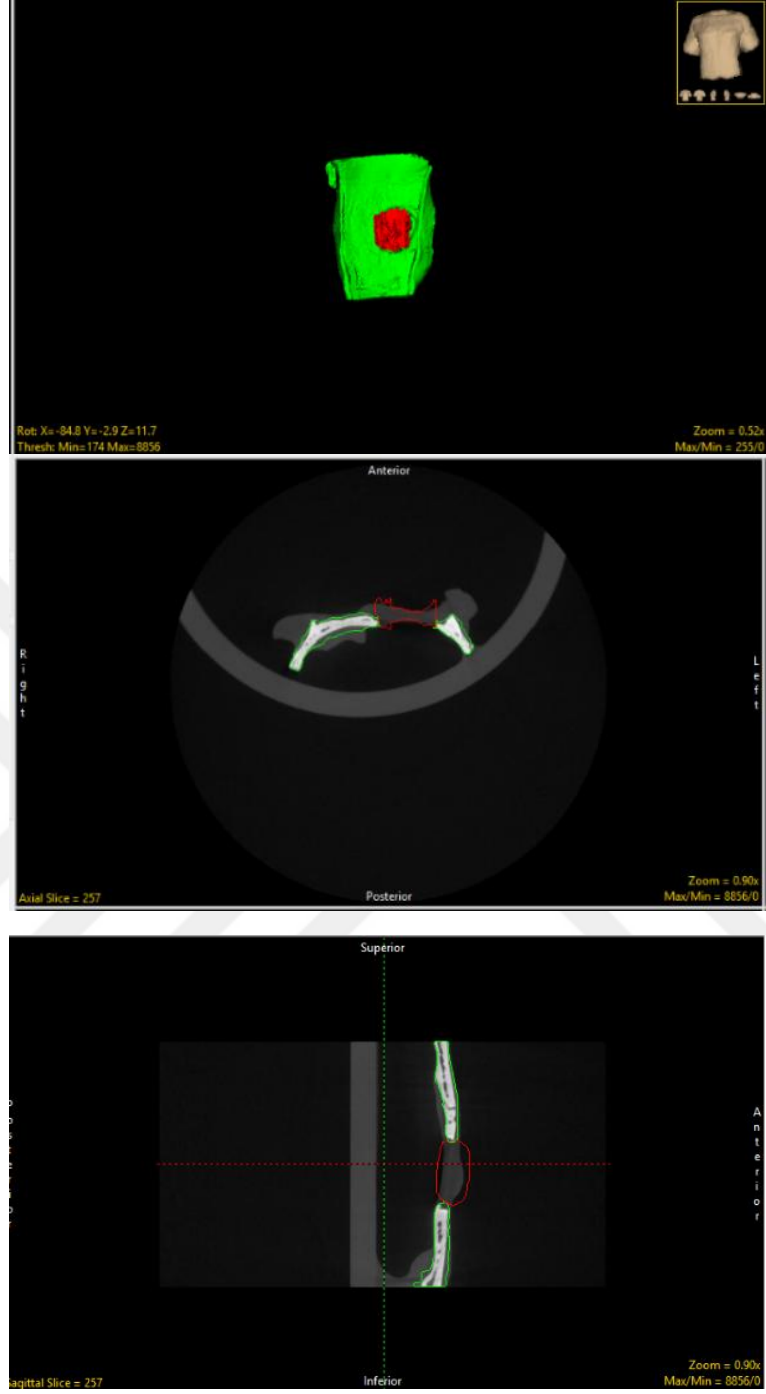
Dokularda meydana getirilen travma sonrasında bölgenin iyileşmesi için gerekli olan hücre ve materyallerin ortama gelmesini sağlayacak yangı açısından da değerlendirilmiştir. Sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Medyan (Min.- Maks.) = 1 (0-2)], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 1 (0-1)], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 1 (1-2)] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 1 (1-3)] değerleri belirlenmiştir. Ölçülen bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise gruplar arasında

çok yüksek derecede anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir ( $p=0,008$ ). Elde edilen sonuçlar, postbiyotik içeren yapı iskelelerinin kontrollere karşı yangı oluşumunda daha etkili olduğunu göstermiştir.

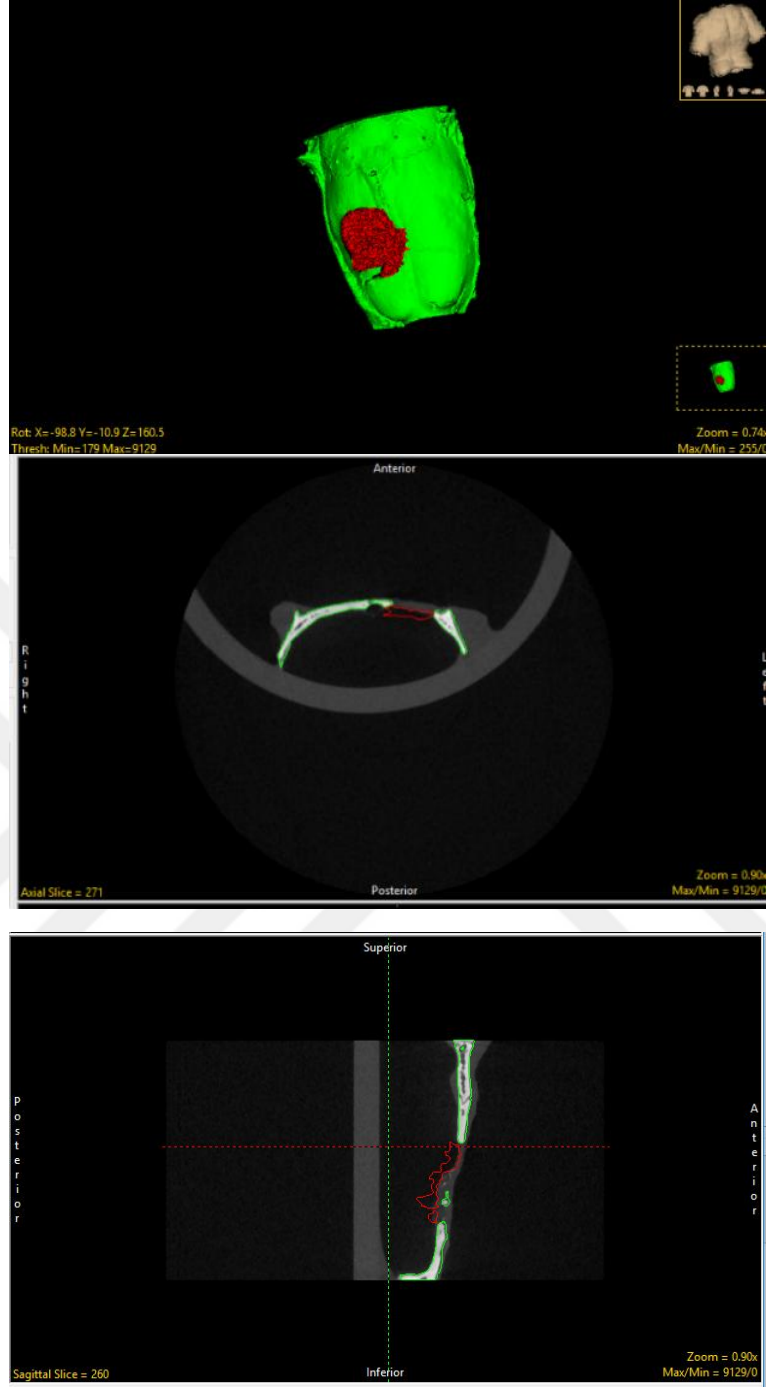
Kalvaryumların travma sonrasındaki sürecinde yangının başlaması ve yangının oluşmasını takiben bölgeye gelecek olan iyileşme materyallerinin travma alanına taşınabilmesi için bölgenin damarlar açısından zengin olması oldukça önem taşımaktadır. Bu sebeple histopatolojik değerlendirme yapılırken bölgenin vaskülarizasyonu da değerlendirilmiştir. Sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (0-2)], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (1-2)], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (1-3)] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Medyan (Min.- Maks.) = 2 (2-3)] sonuçları elde edilmiştir. Elde edilen bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise gruplar arasında çok yüksek derecede anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir ( $p=0,001$ ). Elde edilen sonuçlar, postbiyotik içeren yapı iskelelerinin kontrollere karşı vaskülarizasyon oluşumunda daha etkili olduğunu göstermiştir.

### **3.2.2. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Bulguları**

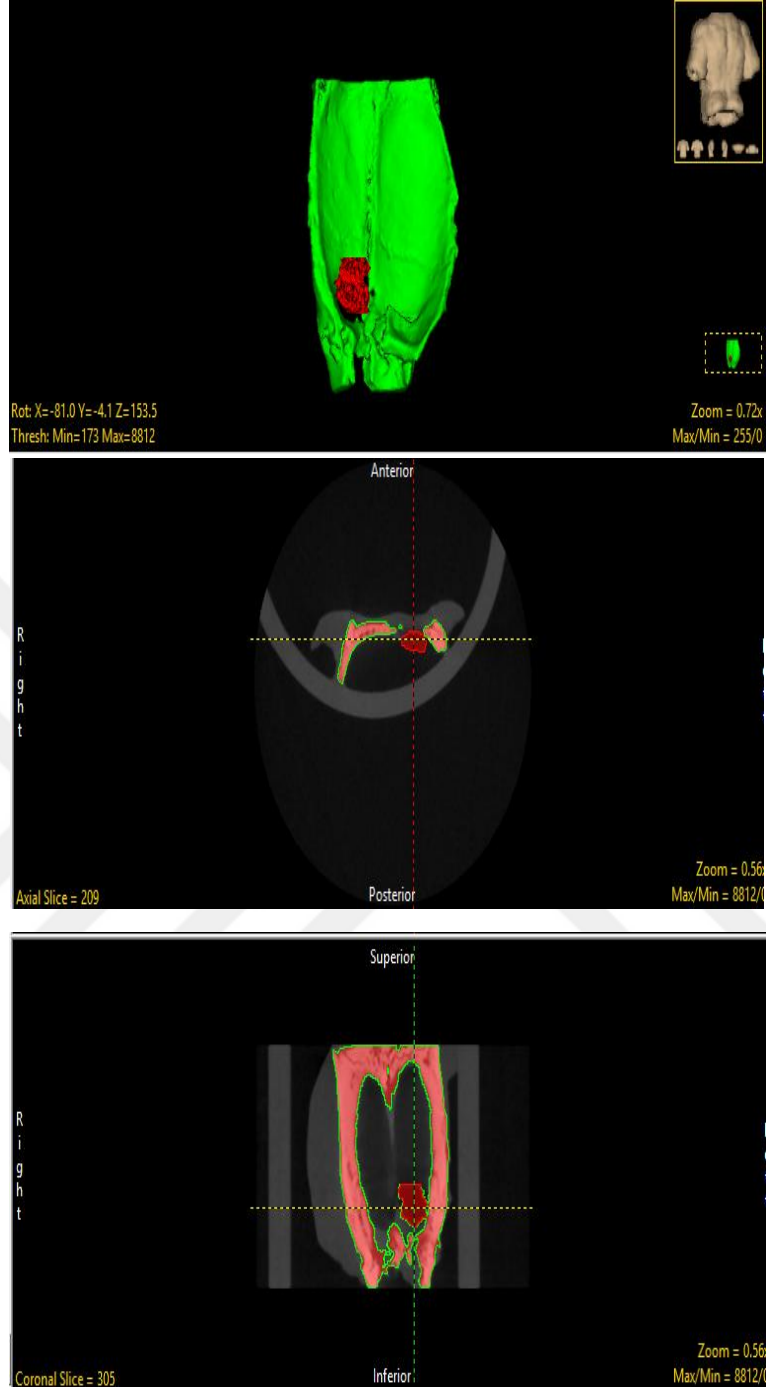
Ötenazi işlemi sonrası uzaklaştırılan kalvaryum örnekleri Mikro BT ile incelenmiş olup elde edilen fotoğraflar Şekil 3.5-3.8’de sunulmuştur.



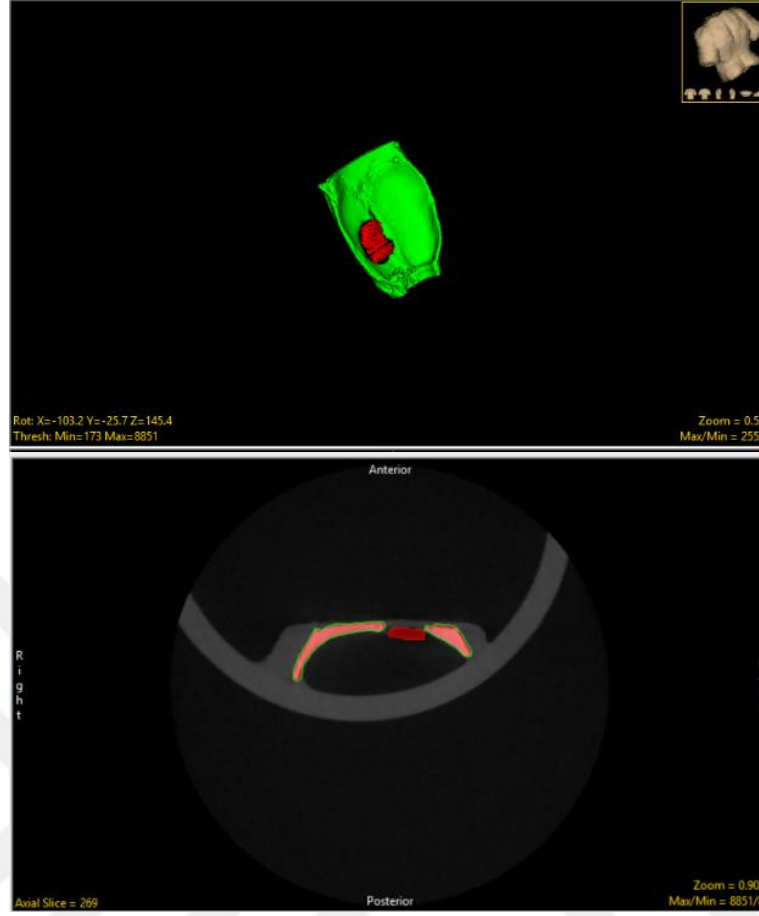
Şekil 3. 5. Sadece defekt oluşturulan kontrol grubuna ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri



**Şekil 3. 6.** Defekt oluşturulan ve yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş gruba ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri



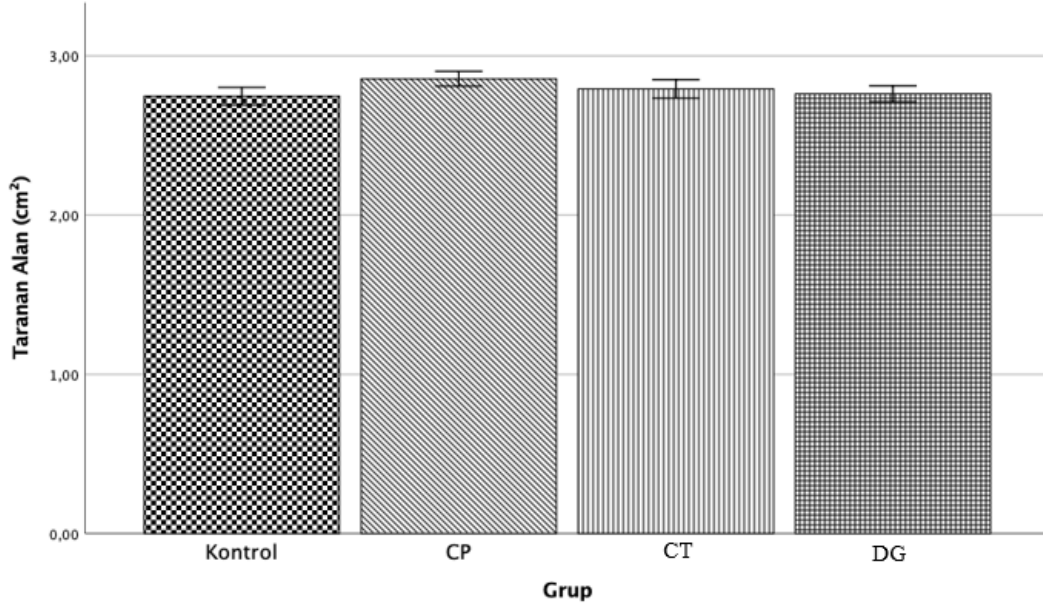
**Şekil 3. 7.** Defekt oluşturulan ve *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri



**Şekil 3. 8.** Defekt oluşturulan ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait bilgisayarlı tomografi görüntüleri

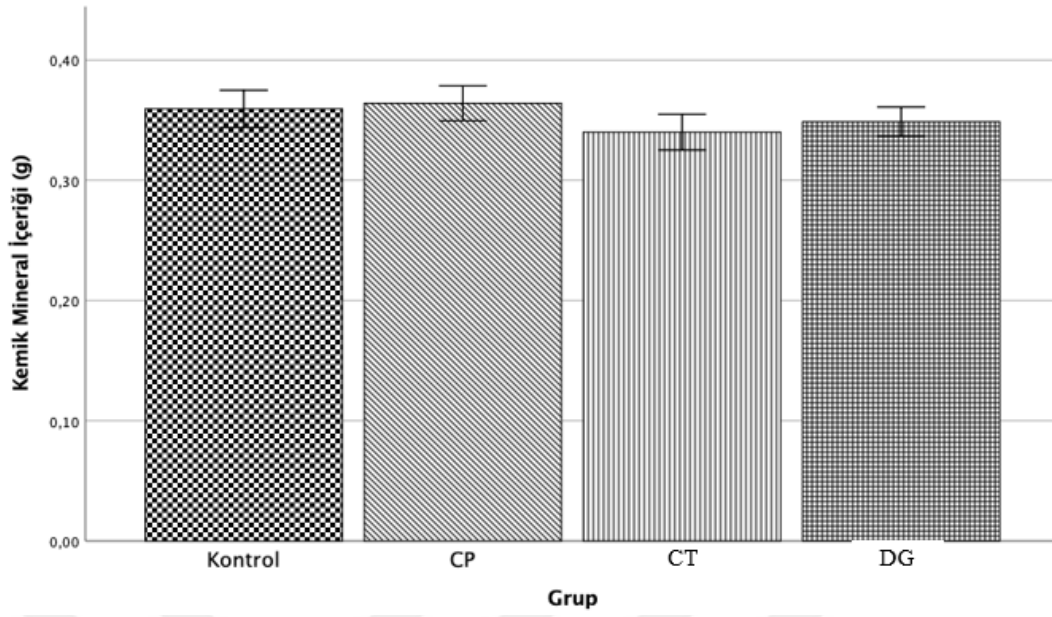
Taramaların her biri kemikler için tek tek yapılmış olup alınan her fotoğraf doğrulama amacıyla üç kez çekilmiş ve daha sonra tek fotoğraf haline getirilerek oluşan kirlilik elimine edilmiştir. Oluşturulan defektlerdeki kemik mineral yoğunluğu ve kemik mineral içeriğinin belirlenebilmesi için yapılan ölçümlerde kalvaryumların kemik yapısına sahip kısımlarının tamamı taranarak taranan alan santimetre kare cinsinden belirlenmiştir. Buna göre, sadece defekt oluşturulan kontrol grubunda [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata=  $2,75 \pm 0,05$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $2,75$  ( $2,28 - 3,05$ )], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grupta [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $2,86 \pm 0,05$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $2,87$  ( $2,4 - 3,11$ )], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grubunda [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $2,79 \pm 0,06$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $2,85$  ( $2,49 - 3,24$ )] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grupta [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $2,76 \pm 0,05$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $2,76$  ( $2,48 - 3,14$ )] değerleri ölçülmüştür (Şekil 3.9). Elde edilen veriler neticesinde gruplar arasında istatistiksel anlamda herhangi bir anlamlı fark gözlemlenmemiştir ( $p=0,489$ ). Bu sonuç, hayvanlardan alınan

kalvaryumların büyüklüğünün birbirine çok yakın olduğunu ve oluşturulan defektlerin karşılaştırılması için gruplar arasında homojen bir dağılım olduğunu göstermiştir.



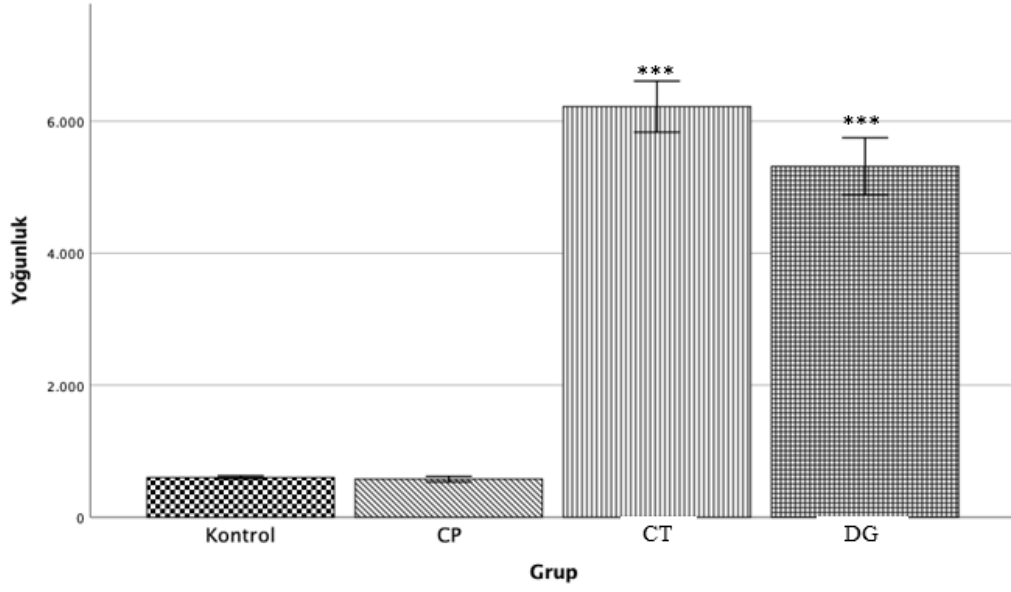
**Şekil 3. 9.** Kemik mineral yoğunluğu ve kemik mineral içeriği ölçümleri için gruplarda yer alan rat kalvaryumlarının taranan alan miktarı (cm<sup>2</sup>) (Kontrol; sadece defekt oluşturulan grup, CP; defekt oluşturulan ve postbiyotiksiz ticari yapı iskelesi uygulanan grup, CT; defekt oluşturulan ve EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup, DG; defekt oluşturulan ve EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup)

Kalvaryumların kemik mineral içerikleri karşılaştırıldığında; sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $0,36 \pm 0,02$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,36$  ( $0,25 - 0,51$ )], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $0,36 \pm 0,01$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,35$  ( $0,25 - 0,44$ )], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $0,34 \pm 0,01$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,33$  ( $0,25 - 0,44$ )] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $0,35 \pm 0,01$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,34$  ( $0,23 - 0,45$ )] değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.10). Bu bilgiler incelendiğinde ise veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p= 0,641$ ).



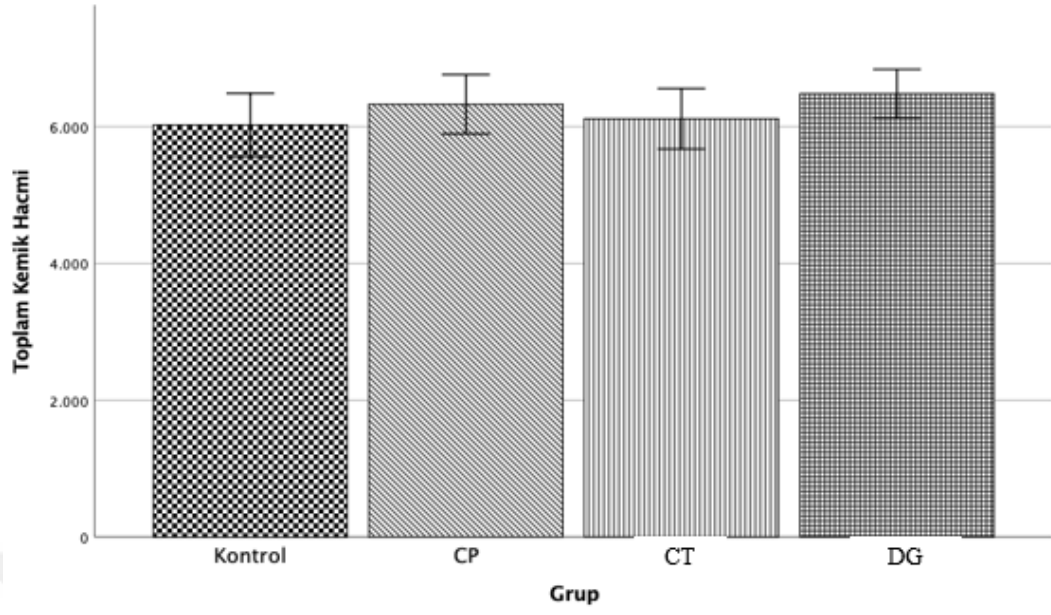
Şekil 3. 10. Rat kalvaryumları toplam kemik mineral içeriklerinin karşılaştırılması

Kemik mineral yoğunluğu  $g/cm^2$  cinsinden hesaplanmıştır. Buna göre, sadece defekt oluşturulan kontrol grubu değerleri [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata=  $0,13 \pm 0$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,13$  ( $0,09 - 0,17$ )], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup değerleri [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $0,13 \pm 0$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,13$  ( $0,09 - 0,15$ )], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup değerleri [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $0,12 \pm 0$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,12$  ( $0,1 - 0,15$ )] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup değerleri [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $0,13 \pm 0$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $0,13$  ( $0,09 - 0,15$ )] şeklinde ölçülmüştür. Kemik mineral yoğunluğu için ölçülen değerler karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ( $p= 0,453$ ). Elde edilen veriler kalvaryumlardaki kemik yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde ise, postbiyotik içeren yapı iskelelerinin kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0,001$ ). Postbiyotikler kendi arasında karşılaştırıldığında ise, kendi mikrobiyotası kaynaklı postbiyotiğin diğerine göre daha etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3. 11.** Rat kalvaryumları toplam kemik mineral yoğunluklarının karşılaştırılması

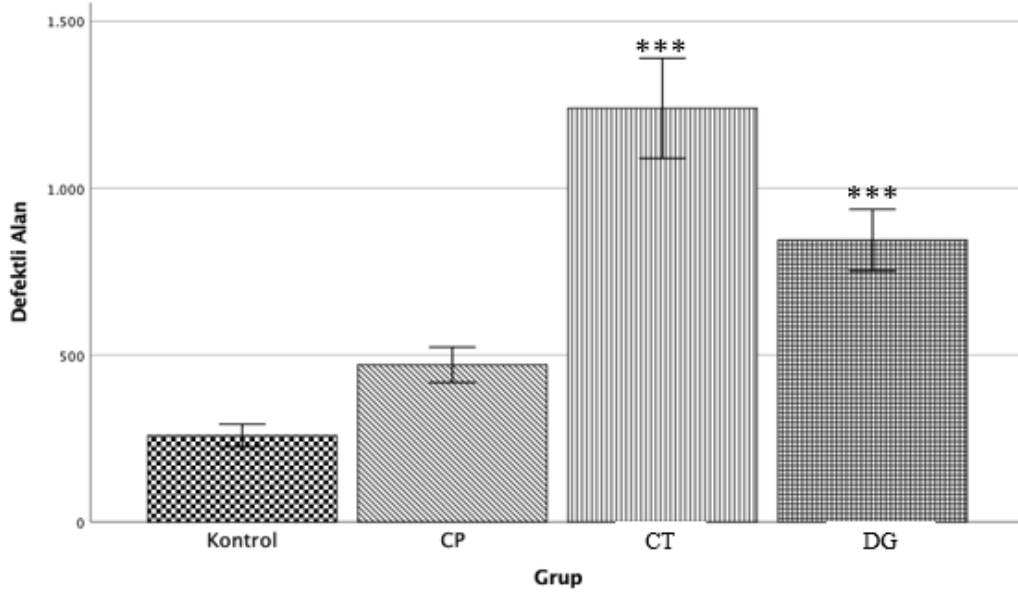
Sonuçlar toplam kemik hacmi açısından değerlendirildiğinde, sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata=  $6024,81 \pm 463,04$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $6067,19$  ( $1771,97 - 8733$ )], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $6328,26 \pm 433,23$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $6167$  ( $1734,5 - 8563$ )], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $6115,58 \pm 441,41$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $6390,82$  ( $1984,5 - 8277,14$ )] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $6481,86 \pm 357,47$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $6693,29$  ( $3430 - 8694$ )] olarak ölçülmüştür (Şekil 3.12). Toplam kemik hacmi için ölçülen değerler karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ( $p=0,869$ ).



Şekil 3. 12. Rat kalvaryumları toplam kemik hacmi miktarlarının karşılaştırılması

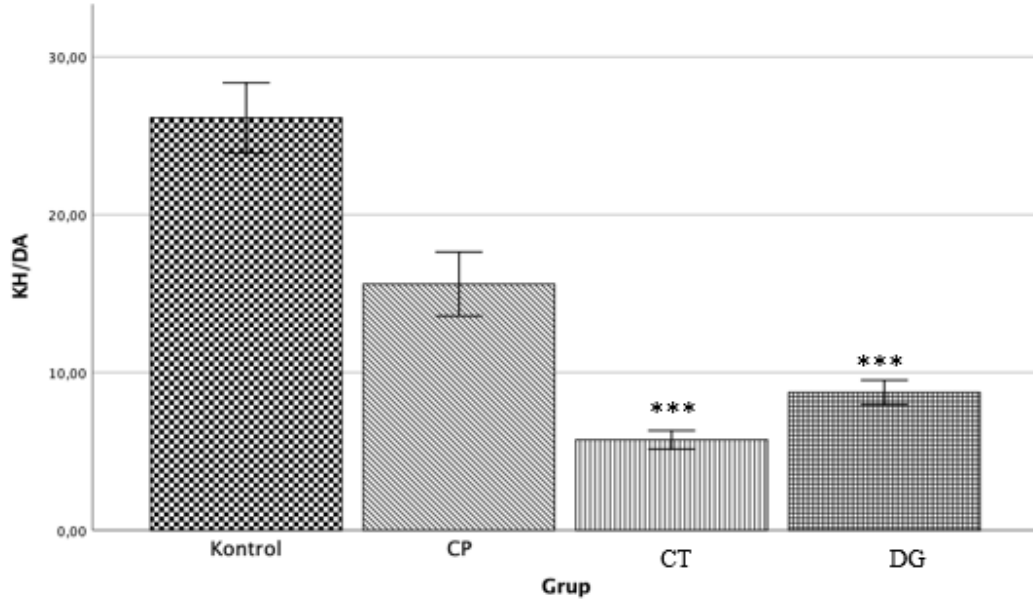
Deney başlangıcında her grupta yer alan tüm hayvanlara 6 mm çapında oluşturulan defektler, deney sonunda defekt olarak kalan alanın (kemik ve/veya kemik oluşumu belirtisi göstermeyen kısımlar) belirlenebilmesi amacıyla tekrar değerlendirilmiştir. Buna göre; sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata=  $258,87 \pm 34,06$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $222,2 (71,53 - 567)$ ], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $470,92 \pm 52,91$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $406,1 (134,2 - 832,42)$ ], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $1239,01 \pm 149,84$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $1118,2 (301,36 - 2809,7)$ ] ve D *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $844,2 \pm 92,23$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $835,87 (395,5 - 1575,5)$ ] değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.13). Defektli alan ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir. Bu değerler arasındaki anlamlı farkın çok yüksek oranda olması, gruplar arasında defekt oluşturulan alanlar içerisinde yer alan kemik ve/veya kemik benzeri oluşum miktarlarının ciddi derecede farklı olduğuna işaret etmiştir. Postbiyotik içeren yapı iskelelerinin kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Postbiyotikler kendi arasında karşılaştırıldığında ise, kedi

mikrobiyotası kaynaklı postbiyotigin diğere göre daha etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3. 13. Rat kalvaryumunda oluşturulan defekt alanlarının gruplar arasındaki karşılaştırması

Toplam kemik hacminin defektli alana oranı karşılaştırıldığında ise sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata=  $26,13 \pm 2,23$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $25,89$  ( $10,8 - 42,27$ )], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $15,6 \pm 2,03$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $13,49$  ( $6,77 - 39,53$ )], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $5,73 \pm 0,59$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $5,43$  ( $2,84 - 11,47$ )] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $8,74 \pm 0,77$  ve Medyan (Min.- Maks.) =  $7,95$  ( $4,52 - 13,45$ )] değerleri ölçülmüştür (Şekil 3.14). Ölçülen bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ). Bu değerler arasındaki anlamlı farkın çok yüksek oranda olması ve bu farkın postbiyotik içeren gruplardan kontrol gruplarına doğru artan şekilde ilerlemesi, gruplar arasındaki ana farklılık olan postbiyotiklerin kemik ve/veya kemik benzeri oluşumların meydana gelmesinde önemli ölçüde rol oynadığına işaret etmiştir.

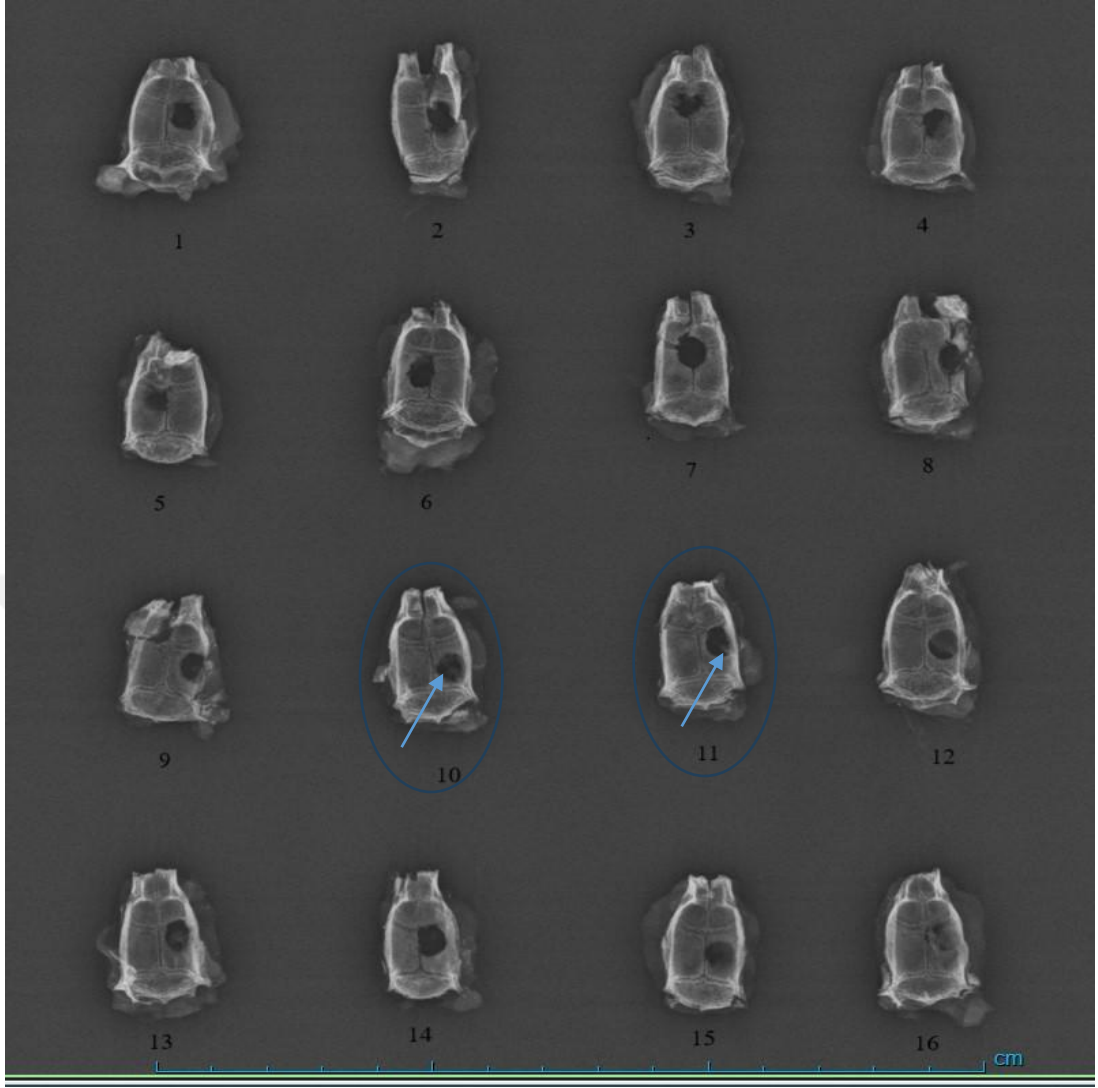


Şekil 3. 14. Toplam kemik hacminin defekt alanına oranının gruplar arasındaki karşılaştırması

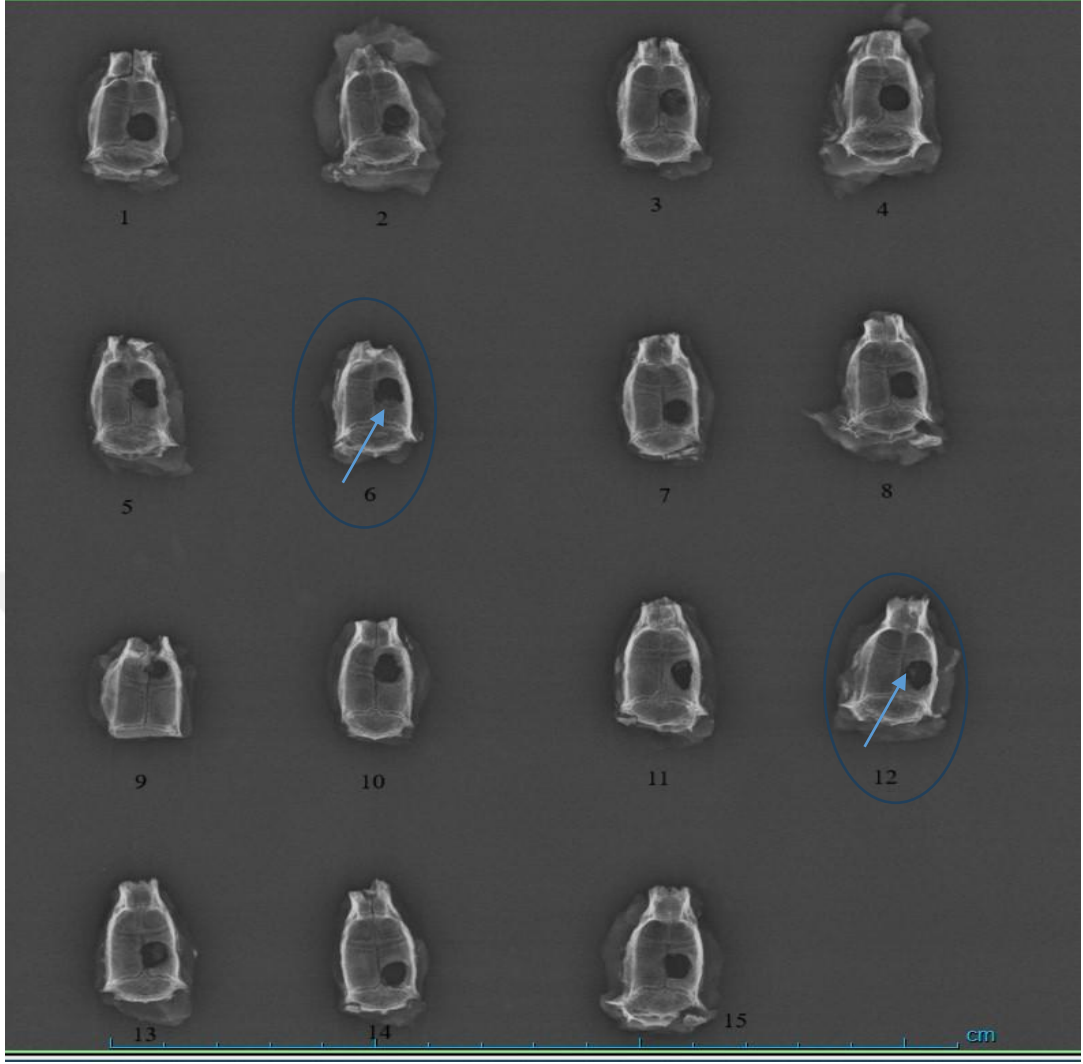
### 3.2.3. Planar Radyografi Bulguları

Ötenazi işlemi sonrası uzaklaştırılan kalvaryum örnekleri planar radyografi ile incelenmiş olup elde edilen fotoğraflar Şekil 3.15-3.18’de sunulmuştur. Kemik köprüleri ve birleşme derecesi puanlama kılavuzu baz alınarak her grupta yer alan kalvaryumların planar radyografi görüntüleri karşılaştırılarak skorlama yapılmış (Çizelge 3.2) ve istatistiksel olarak incelenmiştir.

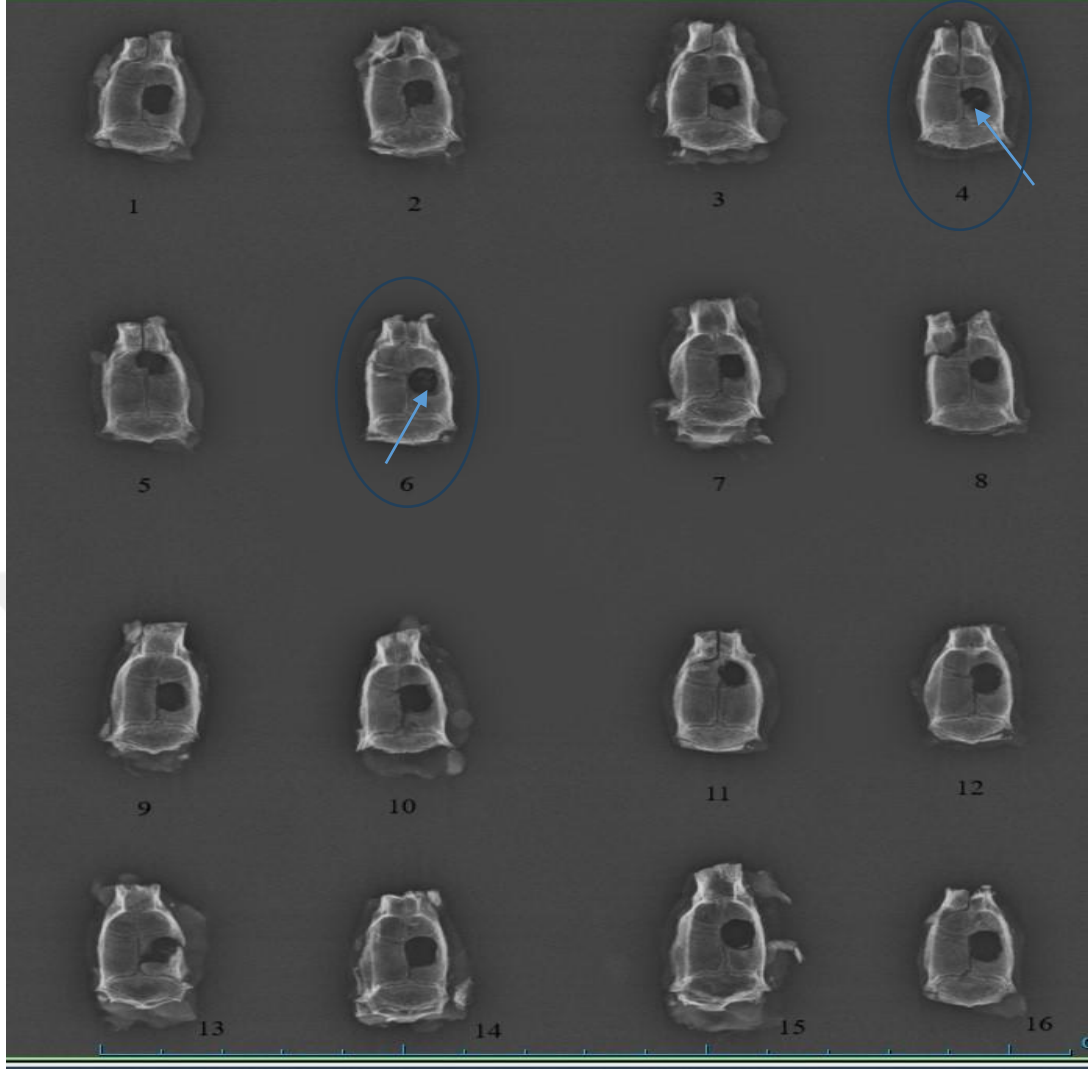
Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; postbiyotik kullanılmış olan grupların sadece defekt oluşturulan kontrol grubu ve yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş gruba kıyasla çok daha fazla kemik oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Postbiyotik içeren gruplar karşılaştırıldığında ise *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grubun *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba kıyasla daha fazla örnekte kemik oluşumu sağladığı tespit edilmiştir.



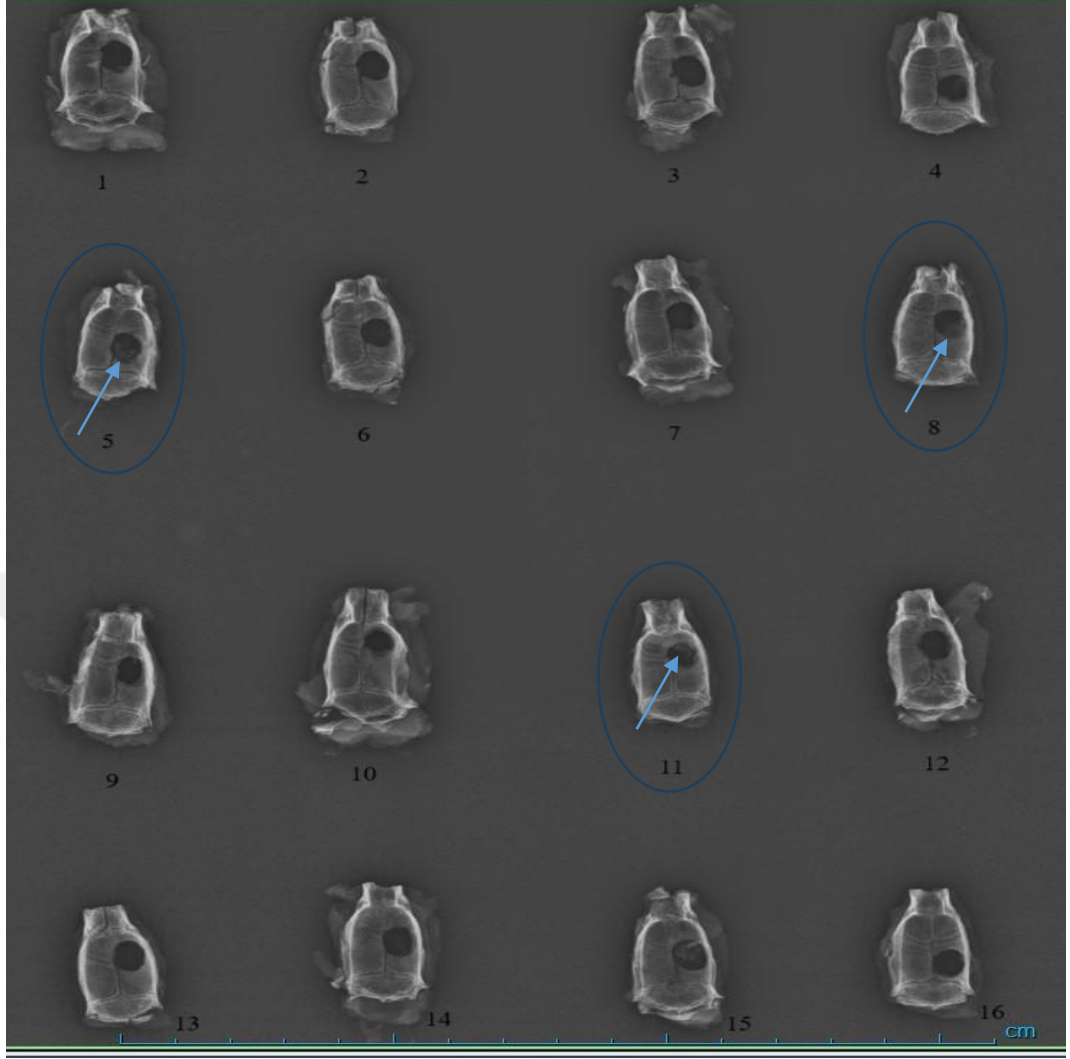
**Şekil 3. 15.** Sadece defekt oluşturulan kontrol grubuna ait planar radyografi görüntüsü (Oklar muhtemel fibröz doku ve/veya kemik oluşumunu göstermektedir.)



**Şekil 3. 16.** Defekt oluşturulan ve yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş gruba ait planar radyografi görüntüsü (Oklar muhtemel fibröz doku ve/veya kemik oluşumunu göstermektedir.)



**Şekil 3. 17.** Defekt oluşturulan ve *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait planar radyografi görüntüsü (Oklar muhtemel fibröz doku ve/veya kemik oluşumunu göstermektedir.)



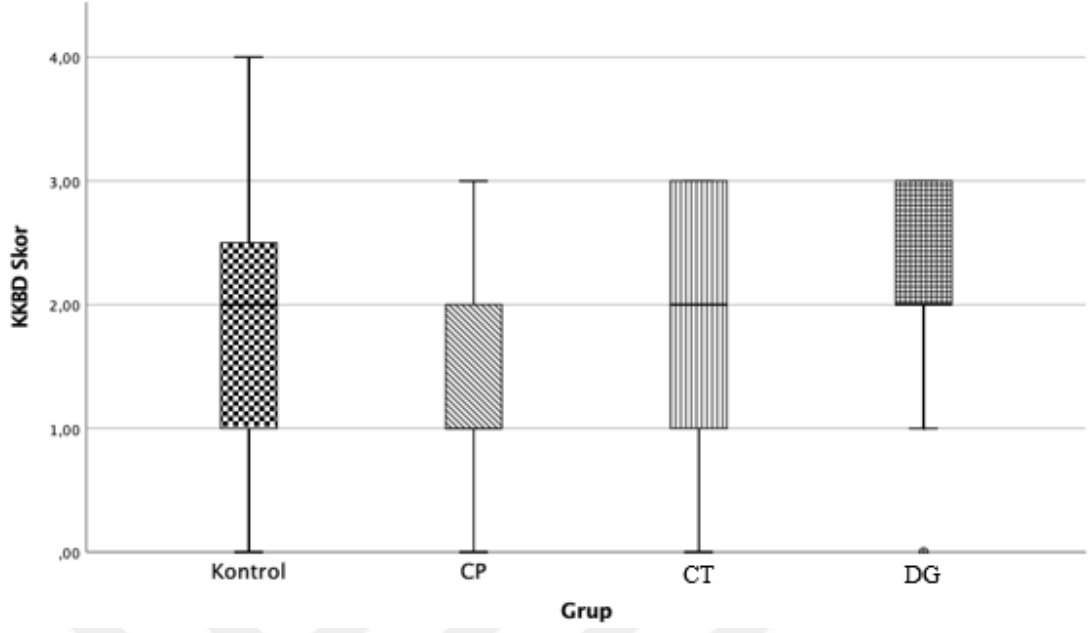
**Şekil 3. 18.** Defekt oluşturulan ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan gruba ait planar radyografi görüntüsü (Oklar muhtemel fibröz doku ve/veya kemik oluşumunu göstermektedir.)

**Çizelge 3. 2.** Kemik köprüleri ve birleşme derecesi için puanlama kılavuzuna göre planar radyografi üzerinden numunelerin skor değerleri

DENEK NUMARALARI	KONTROL GRUBU	CP GRUBU	CT GRUBU	DG GRUBU
1	2	0	2	2
2	1	1	3	3
3	2	3	2	2
4	3	0	2	3
5	2	1	1	3
6	1	2	3	2
7	0	2	1	2
8	1	2	3	3
9	1	1	3	3
10	2	1	3	3
11	1	1	3	3
12	4	2	3	2
13	2	2	1	0
14	1	0	0	2
15	3	1	2	2
16	4	-	1	1
<b>ORTALAMA</b>	1,87	1,26	2,06	2,25

(Kontrol; sadece defekt oluşturulan grup, CP; defekt oluşturulan ve postbiyotiksiz ticari yapı iskelesi uygulanan grup, CT; defekt oluşturulan ve EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup, DG; defekt oluşturulan ve EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup)

Elde edilen veriler dahilinde, sadece defekt oluşturulan kontrol grubu için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $1,87 \pm 0,29$  ve Medyan (Min.- Maks.) = 2 (0-4)], yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $1,27 \pm 0,23$  ve Medyan (Min.- Maks.) = 1 (0-3)], *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $2,06 \pm 0,25$  ve Medyan (Min.- Maks.) = 2 (0-3)] ve *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşuna ait postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grup için [Arit. Ort.  $\pm$  Std. Hata =  $2,25 \pm 0,21$  ve Medyan (Min.- Maks.) = 2 (0-3)] değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.19). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde ise, postbiyotik içerikli ticari yapı iskelesi uygulanan grupların hem sadece defekt oluşturulan kontrol grubuna hem de yalnızca ticari yapı iskelesi yerleştirilmiş gruba kıyasla çok daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir ( $p=0,091$ ).



**Şekil 3. 19.** Kemik Köprüleri ve Birleşme Derecesi Puanlama Kılavuzu kullanılarak elde edilen skorların gruplar arasındaki karşılaştırması

## 4. TARTIŞMA

Mikrobiyotanın iskelet sağlığındaki rolüne yönelik bilimsel çalışmalar hız kazanmıştır (McCabe vd., 2015; Ohlsson ve Sjögren, 2015). Bu durumun temel nedeni, mikrobiyotanın bağışıklık sisteminin birçok yönü üzerindeki bilinen etkisi, bağışıklık sisteminin kemiğin yeniden şekillenmesindeki kritik önemi ve bu iki varlık arasında haberci bir eksen olarak görev yapan gastrointestinal mikrobiyotadan kaynaklanmaktadır (Manolagas, 2010; Pacifici, 2008). Farklı patolojik kemik durumlarında, kemik kaybının birincil nedeni artan osteoklastik kemik rezorpsiyonuna aracılık eden immün sinyallemenin artması ve buna bağlı olarak kemik kaybının ortaya çıkmasıdır (Karieb ve Fox, 2013; Salamanna vd. 2015). Bu bağlamda, bağışıklık sistemi ile kemik sağlığı arasındaki etkileşimlerin odak noktası olan bağışıklık düzenlemesi önem kazanmaktadır (D'Amelio ve Sassi, 2016; Nakashima ve Takayanagi, 2009).

Bağırsak mikrobiyotasının kemik sağlığı üzerindeki etkisi, gastrointestinal sistem mikrobiyotasının farelerde kemik kütlesini düzenleme potansiyeline dair yapılan keşiflerin ardından önem kazanmıştır (Quach ve Britton, 2017). Germ-free farelerin geleneksel olarak yetiştirilmiş hayvanlara kıyasla artmış kemik mineral yoğunluğuna, %39 daha fazla femoral metafizer trabeküler kemik hacmi fraksiyonuna, azalmış osteoklast yüzeyine ve artmış mineralize yüzeye sahip olduğu belirtilmiştir (Sjögren vd., 2012). Bu bulguyu kısmen doğrulayan bir çalışmada ise, dişi germ-free C57Bl/6J farelerinin, trabeküler kemik hacmi fraksiyonunda önemli bir değişiklik olmamasına rağmen, yirmi haftalıkken konvansiyonel olarak büyütölmüş farelere göre daha yüksek femoral kortikal hacmine ve kortikal kalınlığa sahip olduğu bildirilmiştir. Östrojen eksikliği modelinde, germ free dişi C57Bl/6 farelerinin, östrojen üretimini baskılamak için sürekli kullanılan leuprolid tedavisinin ardından kemik kaybindan kurtulduğu rapor edilmiştir. Ancak konvansiyonel olarak yetiştirilen farelerde ise leuprolid tedavisinin ardından kemik kaybı olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2016).

Mikrobiyota üzerine yapılan derinlemesine araştırmalar nedeniyle probiyotikler, sağlığı koruyucu özellikleri nedeniyle son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Probiyotiklerin potansiyel etkileri, immünomodölasyon, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, doğrudan kombinasyon veya patojenlerin rekabetçi inhibisyonunun yanı sıra elektrolit emiliminin ve bağırsak hareketliliğinin düzenlenmesini içeren çoklu mekanizmalar yoluyla

gerçekleşmektedir (Pique vd., 2019). Kemik sağlığına yönelik probiyotiklerle gerçekleştirilen ilk çalışmalar, bakterilerin farklı hayvan hastalık modellerinde kemik kaybı semptomlarını iyileştirebildiğini göstermiştir. Probiyotiklerin kemik sağlığı üzerindeki etkisini gösteren bir diğer çalışmada, *Lactococcus lactis*'in oral yoldan uygulanmasının, yaşlanmayla ilişkili kemik kaybını baskılayabildiği rapor edilmiştir (Kimoto-Nira vd., 2007). *Lactobacillus rhamnosus* GG suşu, leuprolid kullanımından kaynaklanan östrojen eksikliği sırasında kemik kaybını baskılayabilmektedir (Williams vd., 1996). Mikrobiyotada kolonize olan faydalı bakterilerin besin kaynağı olarak gösterilen prebiyotikler ise, kemik için yararlı olan bağırsak mikrobiyota üyelerini uyararak işlev görebilmektedir. Literatür çalışmaları, sindirilmeyen oligosakkaritlerin uygulanmasının ardından kalsiyum emiliminde bir artış olduğunu göstermiştir. Yumurta alımı alınmış Sprague Dawley sıçanları üzerinde yapılan bir çalışmada, inülin ve fruktooligosakkaritlerin alımının, kalsiyum emiliminde ve kemik yoğunluğunda artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, yeterli östrojen seviyelerine sahip olan Sprague Dawley sıçanlarının galaktooligosakkaritlerle beslenmesinin, kemik yoğunluğunun yanı sıra kalsiyum ve magnezyum emilimini de belirgin bir şekilde artırdığı bulunmuştur. Bu deneyde ilginç bir şekilde, bifidobakteri bolluğunda da bir artış tespit edilmiştir (Weaver vd., 2011; Zafar vd., 2004).

Probiyotiklerin kemik sağlığı açısından kullanımları her ne kadar umut vadetse de kalite dalgalanmaları, kısa raf ömrü, heterojen etkileri ve saklama koşullarındaki stabilizasyon temel sorunlar probiyotik uygulamalarını sınırlamaktadır (Salminen vd., 2021). Bu sorunları çözmek amacıyla, özellikleri daha güvenli ve daha stabil olan, saklanması daha kolay ve antimikrobiyal direnç riski daha az olan postbiyotiklerin kullanımı dikkat çeken bir araştırma ve uygulama alanı haline gelmiştir. Günümüzde postbiyotiklerin kullanımı, sadece fermente gıda endüstrisinde değil, aynı zamanda sağlık alanında da özellikle gastrointestinal hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalık için umut verici bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilmeye başlamıştır. Farklı postbiyotiklerin *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* etkinliklerinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Hijova vd., 2024; Zhao vd., 2024). Ancak, kemik doku rejenerasyonunda kullanımına yönelik sınırlı literatür bilgisi bulunmaktadır (Han vd., 2024). Örneğin, menapoz sonrası gelişen osteoporosis için güncel tedavi protokollerinin sebep olduğu şiddetli yan etkilere karşı alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülen postbiyotiklerin değerlendirildiği bir çalışmada, ovariektomi olan sıçanlarda postbiyotiklerin femur bölgesinde önemli derecede iyileşme sağladığı rapor edilmiştir. *Lactobacillus casei* ve *Bacillus coagulans* lizati ve süpernatantının yanı sıra *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus acidophilus* lizatının

kemik mineral yoğunluğunu önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, postbiyotiklerin osteoporoz tedavisinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Montazeri-Najafabady vd., 2021). Bu çalışmalar ışığında, tez çalışmasında kolajen üzerine uygulanacak ajan seçimi tercihinde postbiyotik kullanımı öne çıkmıştır. Bu sayede kullanılan postbiyotiğin kemik rejenerasyonunu hızlandırabileceği düşünülmüştür.

Veteriner hekimlikte kemik rejenerasyonu için kemik greftleri (yapı iskeleleri) sıklıkla kullanılmaktadır. Kemik defektlerini tedavi etmek için “mükemmel iskele”, doğal kemiğin özelliklerini taklit eden, yapısında ideal olarak yaşayan ve bölünen progenitör hücreleri içeren biyomalzemeleri içermektedir. Böyle bir ortam, yalnızca kemik dokusunun büyümesini ve farklılaşmasını değil, aynı zamanda onun vaskülarizasyonunu ve hatta doğal kemikte bulunan çok sayıda sinyal molekülünün, büyüme faktörünün ve metabolitin varlığını gerektiren innervasyonunu da destekleyecektir. Böyle bir sistemin karmaşıklığı, mükemmel iskelenin imalatında ve stabilitesinin ve yaşayabilirliğinin sağlanmasında sorunlara neden olmaktadır (Szwed-Georgiou vd., 2023). Dolayısıyla, bu tez çalışmasında da uygulandığı gibi çoğunluğu kolajen temelli olan greftlerin çeşitli biyoaktif ajanlarla işlevselleştirilmesi, malzeme üretim yaklaşımlarındaki teknolojik boşlukların aşılması adına önemli kabul edilmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, kedi mikrobiyotası kaynaklı *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 ve köpek mikrobiyotası kaynaklı *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşlarına ait postbiyotiklerin veteriner hekimlikte karşılaşılan kemik dejenerasyonuna yönelik potansiyel etkileri ticari bir yapı iskelesine entegrasyonları neticesinde *in vivo* koşullar altında değerlendirilmiştir. *In vivo* çalışmalardan önce postbiyotiklerin yapı iskelesine entegre edilecek dozu hücre kültürü çalışmaları neticesinde belirlenmiştir. Bu amaçla, fare preosteoblast hücreleri kullanılmış ve toksisite göstermeyen en yüksek doz ilerleyen çalışmalara dahil edilmiştir. Benzer şekilde, Chen vd. (2020) *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* suşlarına ait postbiyotiklerin osteoblast MC3T3-E1 hücreleri üzerinde toksik etki göstermediğini bazı dozların ise proliferasyonu arttırdığını rapor etmişlerdir.

*In vivo* çalışma kapsamında rat kalvaryumu kritik boyutlu defekt modeli kullanılmıştır. Literatürde de benzer modelin kullanıldığı çalışmalara sıklıkla rastlanılmaktadır (Chimedtseren vd., 2023). *In vivo* deneyler için, ratların bilinçlerinin kapalı

olduğundan emin olunduktan sonra, rat kalvaryumu bölgesinde kafa derisi uzaklaştırılmış ve kafatasının tam ortasında, rat kalvaryumunun fabrikasyon yapı iskelelerin çapı (6 mm) kadar bir alan çıkarılmıştır. Kemik ve kalvaryum hasarının olduğu bölgeye implante edilen postbiyotikli ve postbiyotiksiz yapı iskelelerin etkinliği 45 gün sonra değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, postbiyotik uygulanan gruplarda yeni kemik oluşumunun yanı sıra çok ciddi miktarlarda fibröz doku oluşumu bulunduğu tespit edilmiştir. Yaralanan dokuların iyileşme süreci göz önüne alındığında bölgede fibröz doku oluşumunun hasar görmüş olan doku ve/veya hücrenin remodelizasyonu tamamlanmadan bölgedeki hasarı minimize etmek amacıyla hızlıca travma bölgesinde meydana geldiği bilinmektedir. Ayrıca travma sonrası mast hücrelerinin defekt bölgesindeki yangıyı tetiklediğini ve kemik onarımına katkı sağladığını düşündürmektedir. Değerlendirme kriterlerinden biri olan yangıda gruplar arasında meydana gelen yüksek fark ise, postbiyotik içeren yapı iskelelerinin bulunduğu gruplardaki yangı hücresi miktarının oldukça fazla olduğunu göstermektedir. Bu durum iyileşmenin daha hızlı gerçekleşebilmesi için gerekli materyallerin bölgeye göçünü mutlak suretle hızlandırmaktadır. Buna bağlı olarak fibröz doku oluşumu başta olmak üzere yeni kemik oluşumu da hız kazanmaktadır. Bir diğer değerlendirme kriteri olan vaskülarizasyonda ise meydana gelen yüksek fark, grupların minimum ve maksimum medyan miktarlarında da görüldüğü üzere, postbiyotik içeren yapı iskelelerin bulunduğu gruplarda vaskülarizasyonun çok yüksek miktarda bulunduğunu göstermiştir. Bu durum da bölgenin iyileşmesi açısından kontrol gruplarına kıyasla oldukça hız kazanılabileceğine işaret etmiştir. Ancak, tam iyileşmenin sağlanabilmesi için daha fazla takip süresine ihtiyaç duyulduğuna karar verilmiştir.

An vd. (2017) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; kemik grefti (BG) malzemesi içeren veya içermeyen dehidrotermal (DHT) çapraz bağlı kollajen membranın kemik rejenerasyon etkinliği kritik boyutlu rat modelinde değerlendirilmiştir. Dört gruba randomize edilen 40 ratın kalvaryumunda 8 mm çapında defekt oluşturulmuştur. Değerlendirmeler ameliyattan 2 ve 8 hafta sonra mikro BT, histolojik ve histomorfometrik analizler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mikro-BT analizi neticesinde, BG ve DHT+BG gruplarının yeni kemik hacminde ameliyattan 2 hafta sonra anlamlı bir farkı temsil eden artış tespit edilmiştir. Ameliyattan 8 hafta sonra yeni kemik hacmi dört grupta da artmıştır. Ancak BG ve DHT+BG gruplarında daha fazla kemik hacmi gözlenmiştir. Elde edilen veriler, mevcut kemik greftinin modifiye edilmiş formu olan DHT membranının yeterli doku entegrasyonuna sahip güvenli bir biyomateryal olduğunu ve yeni kemik oluşumu üzerinde olumlu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, hidrolik presle yüksek oranda

preslenmiş nano-hidroksiapatit/kollajen (P-nHAP/COL) greftlerinin preslenmiş kollajene karşı daha üstün özellikler sergilediği, 10 haftalık Wistar ratların kranial kemiklerinde oluşturulan kritik boyutlu kemik defektinin 8 hafta boyunca takibi neticesinde belirlenmiştir (Hatakeyama vd., 2022). Bu çalışmalar, mevcut ticari greftlerin gerek üretim gerekse içerik açısından modifiye edilmesinin potansiyel etkilerine olumlu yönde katkı sağlanabileceğine vurgu yapmıştır. Gerçekleştirilen tez çalışmasında ise, mevcut ticari kolajen temelli greftlerin kemik rejenerasyonu üzerindeki etkinliği postbiyotik kullanılarak geliştirilmiştir. Postbiyotiklerin belirlenen hedefe yönelik kullanımını içeren benzer bir çalışmaya ise literatürde rastlanmamıştır.

Tez çalışmasında kullanılan modele benzer şekilde, Chimedtseren vd. (2023) orta çapraz bağlı rekombinant kollajen peptidin (mRCP) kemik oluşturma potansiyelini kemik kusurlu hayvan modellerinde incelemişlerdir. Araştırmacılar daha önce gerçekleştirdikleri çalışmalar kapsamında sıçan kritik boyutlu kalvaryum defekt modelinde 4 haftalık implantasyondan sonra mRCP'nin kemik oluşturma potansiyelini incelemişler (Akiyama vd., 2021; Yamahara vd., 2022) ve 4 haftalık gözlem süresinin yetersiz olduğuna karar verip çalışmayı 12 haftalık uzun bir gözlem süresiyle tekrar etmişlerdir. Benzer şekilde, kemik greftleriyle alveolar yarık onarımı hedefleyen klinik araştırmalar da ortodontik hareketin yeterli kemik yoğunluğuna ulaşıldığında ve kemik greft rezorpsiyonu tamamlanmadığında greftlemeden 12 hafta sonra başladığını rapor etmektedir (Xiao vd., 2016). Benzer şekilde, insan alveolar yarık onarımında, greft cerrahisinden 12 hafta sonra kemik yapısı ve alveolar yükseklik stabil hale geldiği belirlenmiş olup 12 haftalık tedavi önerilmektedir (Zhang vd., 2015). Bu çalışmada, kontrol grubu olarak karbonat apatit bazlı bir bileşime sahip olan Cytrans (CA) granüllerini kullanmışlardır. Negatif kontrol için kusurlar tedavi edilmeden bırakılmıştır. Defektteki kemik hacmi, toplam kemik hacmi ve kemik mineral yoğunluğu, implantasyondan sonraki 0, 4, 8 ve 12. haftalarda mikro CT kullanılarak değerlendirilmiştir. H&E ile boyanmış kesitlerin histomorfometrik analizleri neticesinde ise tüm defekt bölgesindeki yeni oluşan kemik miktarı, toplam yeni oluşan kemik ve ayrıca yeni oluşan kemiğin miktarı analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular neticesinde, mRCP grubunda kemik hacminin zamanla arttığı ve ameliyattan sonraki 8. ve 12. haftalarda 4. haftaya göre anlamlı derecede daha fazla kemik oluşumu gözlemlendiği rapor edilmiştir. 12 hafta sonra mRCP grubunun BMD'si aynı zaman noktasında doğal kalvaryum kemiğine benzer seviyelere ulaşmıştır. H&E ile boyanmış bölümler, CA ve kontrol gruplarına kıyasla mRCP grubunda implantasyondan 12 hafta sonra daha fazla miktarda yeni oluşan kemiği ortaya çıkarmıştır. Elde edilen veriler, kemik rejenerasyonu için 12 haftalık takibin uygunluğunu önermiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikrobiyota kaynaklı postbiyotiklerin kemik dokusu ile olan karmaşık ve dinamik etkileşiminin aydınlatılması, kas-iskelet sistemi sağlığı ve hastalıkları konusundaki anlayışımızı ilerletmek için hızla gelişen bir alanı temsil etmektedir. Günümüze kadar elde edilen bilimsel kanıtlar, postbiyotiklerin mineral alımını kolaylaştırma, kemik mineralizasyonunu destekleme, K vitamini üretimi, osteojenik farklılaşma, kondrojeniz, kemik oluşumu ve emilimi gibi birçok önemli rollere sahip olduğunu ve bu potansiyel etkilerini çeşitli sinyal yollarını aktive ederek ya da baskılayarak gösterdiklerini rapor etmektedir. Ancak, ileriye dönük olarak, kemik üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekmektedir. Bu süreçlerde yer alan spesifik sinyal yollarının ve moleküler etkileşimlerin açıklığa kavuşturulması, çeşitli kemik hastalıklarının önlenmesi ve tedavisi için yeni terapötik hedefleri ortaya çıkarabilecektir. Bununla birlikte, mikrobiyal metabolitlerin geleneksel tedaviler veya diyet müdahaleleri ile potansiyel sinerjistik etkilerinin araştırılması, kas-iskelet sağlığının geliştirilmesi için daha etkili stratejilere yol açabilecektir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması, veteriner hekimlikte önemli bir sorun olan kemik rejenerasyonu için kedi köpek mikrobiyotası kaynaklı postbiyotiklerin kullanım potansiyelini belirlemeyi hedeflemiştir. Postbiyotik üreticisi olarak seçilen suşlar yerel izolatlar olup daha önceki çalışmalar neticesinde probiyotik özellikleri kanıtlanmış bakterilerdir. İlk kez bu çalışma kapsamında kemik rejenerasyonuna yönelik etkileri değerlendirilmiştir. Postbiyotik etkinliğin konağa özgü spesifik sinyal yollarını indükleyebilme potansiyeli dikkate alındığında ise kedi ve köpek orijinli postbiyotiklerin kullanılması veteriner hekimlikteki uygulanabilirliği açısından önem arz etmektedir. Dolayısıyla, hedefe yönelik tedavi için kedi köpek orijinli postbiyotiklerin kullanıldığı ilk çalışma olması açısından önemli olan tez çalışması, ticari bir yapı iskelesine entegrasyon ve rat kalvaryumunda oluşturulan defekte karşı yeni bir ürün formülasyonu tasarlamak adına da özgünlük içermektedir. Ancak, hedefe yönelik doz seçimi için sadece preosteoblast hücreleri üzerinde gerçekleştirilen analizlerden elde edilen veriler dikkate alınmıştır. *In vivo* çalışmaların maliyeti ve zorluğu açısından tek dozun çalışmalara dahil edilmesi uygun bulunmuştur. *In vivo* çalışmada defektin bulunduğu alanda sadece kemik hücreleri değil aynı zamanda diğer dokulara ait hücrelerin de bulunduğu dikkate alındığında ise, postbiyotik uygulamasının farklı konsantrasyonlarının denenmesi sonuçların daha farklı eldesine imkân verebilecektir. Bu sebeple, ileride gerçekleştirilecek çalışmalarda farklı postbiyotik konsantrasyonlarını içeren membranların

kullanımı, çevre dokulara karşı reaksiyon payı olarak değerlendirilip kemik çalışmaları için daha efektif sonuçların eldesi için önerilmektedir.

Tez çalışması kapsamında, tekir ırkı kedinin fekal mikrobiyotasından izole edilen *Enterococcus faecium* EIR/CT-1 ve kangal ırkı köpek süt mikrobiyotasından izole edilen *Enterococcus lactis* EIR/DG-1 suşlarına ait postbiyotikler elde edilmiş, *in vitro* hücre kültürü çalışmaları neticesinde fare preosteoblast hücreleri üzerinde toksik etki sergilemediği gözlemlenen 1.000 µg/ml dozları ticari olarak temin edilen yapı iskelesine emdirme yoluyla entegre edilmiştir. Kemik rejenerasyon potansiyellerini belirlemek amacıyla rat kalvaryumunda defekt modeli oluşturulmuştur. Uygulamaları takiben, postbiyotik içeren yapı iskelelerinin etkinliği postbiyotik içermeyen yapı iskelelerine ve kontrol grubuna karşı etkinliği planar radyografi, bilgisayarlı tomografi ve histopatolojik incelemeler açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde, tam bir kemik oluşumu sağlanmamış olsa da postbiyotiklerin travma bölgesinde meydana getirilen hasarın onarılmasında önemli bir rol oynadığı ve iyileşme sürecini hızlandırdığı tespit edilmiştir. Özellikle, fibröz doku miktarının ciddi oranda hızlanması ve artması, yangı ve vaskülarizasyon miktarının postbiyotik içeren gruplarda yüksek derecede anlamlı fark yaratması yeterli süre bekleme sağlandığı takdirde kemik oluşum sürecini de hızlandırabileceğini düşündürmektedir. Bu kapsamda daha net sonuçlar elde edilebilmesi için çalışmaların ilerletilerek detaylandırılması ve daha spesifik sonuçlar sağlayabilecek parametrelerin kullanılması önerilmektedir. Bu süreçlerde yer alan spesifik sinyal yollarının ve moleküler etkileşimlerin açıklığa kavuşturulması, kemik hasarının önlenmesi ve tedavisi için yeni terapötik hedefleri ortaya çıkarabilecektir. Dolayısıyla, postbiyotiklerin canlı organizmalar üzerindeki etkisine dair anlayışımız büyümeye devam ettikçe, bunların klinik ve beslenme ortamlarının yanı sıra veteriner hayvancılıktaki uygulamalarının da genişlemesi hedeflenmektedir.

Sonuç olarak elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde, hayvanlarda travma, neoplazi, kronik enfeksiyon ve benzeri nedenlerle meydana gelen kemik dejenerasyonunun iyileştirilmesi ve ortaya çıkan maddi kaybın kemik sağaltım yöntemleri kullanılarak daha hızlı ve efektif şekilde tolere edebilmesi amacıyla, postbiyotiklerin mevcut yapı iskeleleri için önemli bir biyoaktif materyal kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Ancak, postbiyotiklerdeki belirsiz bileşenlerin tanımlanması için ileri teknolojilerin kullanılması da ürün kalitesinin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte, bu postbiyotik bileşenlerin saflaştırılması ve etken temel molekülün tespiti, daha yüksek

masraflara yol açabileceği göz önüne alındığında, etkinlik ve ekonomik fizibilite arasındaki optimal dengenin bulunması açısından ayrıca değerlendirilmelidir.



## KAYNAKLAR

- Agarwal, R. and García, A. J. (2015). Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 94, pp. 53–62). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.013>
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B. & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science and Technology*, 75(February), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Akiyama, Y., Ito, M., Toriumi, T., Hiratsuka, T., Arai, Y., Tanaka, S., Futenma, T., Akiyama, Y., Yamaguchi, K., Azuma, A., Hata, K. ichiro, Natsume, N. & Honda, M. (2021). Bone formation potential of collagen type I-based recombinant peptide particles in rat calvaria defects. *Regenerative Therapy*, 16, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.12.001>
- Albrektsson T, Jansson T, Lekholm U. (1986). Osseointegrated dental implants. *Dent Clin North Am.* Jan;30(1):151-74. PMID: 3514290.
- Almubarak, S., Nethercott, H., Freeberg, M., Beaudon, C., Jha, A., Jackson, W., Marcucio, R., Miclau, T., Healy, K. & Bahney, C. (2016). Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. In *Bone* (Vol. 83, pp. 197–209). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.011>
- Amini, A. R., Laurencin, C. T. & Nukavarapu, S. P. (2012). *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*.
- An, Y. Z., Heo, Y. K., Lee, J. S., Jung, U. W. & Choi, S. H. (2017). Dehydrothermally Cross-Linked Collagen Membrane with a Bone Graft Improves Bone Regeneration in a Rat Calvarial Defect Model. *Materials*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/ma10080927>
- Andreasen, C. M., Delaisse, J. M., van der Eerden, B. C. J., van Leeuwen, J. P. T. M., Ding, M. & Andersen, T. L. (2018). Understanding Age-Induced Cortical Porosity in Women: The Accumulation and Coalescence of Eroded Cavities Upon Existing Intracortical Canals Is the Main Contributor. *Journal of Bone and Mineral Research*, 33(4), 606–620. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3354>
- Andreux, P. A., Blanco-Bose, W., Ryu, D., Burdet, F., Ibberson, M., Aebischer, P., Auwerx, J., Singh, A. & Rinsch, C. (2019). The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nature Metabolism*, 1(6), 595–603. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0073-4>
- Aoki, R., Kamikado, K., Suda, W., Takii, H., Mikami, Y., Suganuma, N., Hattori, M. & Koga, Y. (2017). A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43522>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., Deroos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J. & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>

- Aulthouse A. L. & Hitt, D. C. (1994). The Teratogenic Effects of Valproic Acid in Human Chondrogenesis In Vitro. In *TERATOLOGY* (Vol. 49).
- Banihashemi, M., Mohkam, M., Safari, A., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Mohammadi, F., Kianpour, S. & Ghasemi, Y. (2015). Optimization of three dimensional culturing of the HepG2 cell line in fibrin scaffold. *Hepatitis Monthly*, 15(3). <https://doi.org/10.5812/hepatmon.22731>
- Barcak, E. A. and Beebe, M. J. (2017). Bone Morphogenetic Protein: Is There Still a Role in Orthopedic Trauma in 2017 In *Orthopedic Clinics of North America* (Vol. 48, Issue 3, pp. 301–309). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2017.03.004>
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Birkhold, A. I., Razi, H., Weinkamer, R., Duda, G. N., Checa, S. & Willie, B. M. (2015). Monitoring in vivo (re)modeling: A computational approach using 4D microCT data to quantify bone surface movements. *Bone*, 75, 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.027>
- Breeland G, Menezes RG (2020). *Embryology, bone ossification*. In: StatPearls [Internet], StatPearls Publishing
- Bush R. S. and Milligan, L. P. (1971). *STUDY OF THE MECHAISM OF INHIBITION OF KETOGENESIS BY PROPIONATE IN BOVINE LIVER The 3-hydroxy-3-methylglu-achieved, at least in part, through inhibition taryl-CoA pathway appeared to be the major of formation of acetoacetate from aceto-route for formation of acetoacetate from acetyl-CoA. acetoacetyl-CoA in liver extracts, on the basis.* www.nrcresearchpress.com
- Burks, A. W., Harthorn, L. F., van Ampting, M. T. J., Oude Nijhuis, M. M., Langford, J. E., Wopereis, H., Goldberg, S. B., Ong, P. Y., Essink, B. J., Scott, R. B. & Harvey, B. M. (2015). Synbiotics-supplemented amino acid-based formula supports adequate growth in cow's milk allergic infants. *Pediatric Allergy and Immunology*, 26(4), 316–322. <https://doi.org/10.1111/pai.12390>
- Cantley, M. D., Fairlie, D. P., Bartold, P. M., Rainsford, K. D., Le, G. T., Lucke, A. J., Holding, C. A. & Haynes, D. R. (2011). Inhibitors of histone deacetylases in class I and class II suppress human osteoclasts in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 226(12), 3233–3241. <https://doi.org/10.1002/jcp.22684>
- Chabane, N., Zayed, N., Afif, H., Mfuna-Endam, L., Benderdour, M., Boileau, C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., Duval, N. & Fahmi, H. (2008). Histone deacetylase inhibitors suppress interleukin-1 $\beta$ -induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(10), 1267–1274. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.03.009>
- Chambers, E. S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D. J., Murphy, K. G., Zac-Varghese, S. E. K., MacDougall, K., Preston, T., Tedford, C., Finlayson, G. S., Blundell, J. E., Bell, J. D., Thomas, E. L., Mt-Isa, S., Ashby, D., Gibson, G. R., Kolida, S., Dhillo, W. S., Bloom, S. R., Frost, G. (2015). Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*, 64(11), 1744–1754. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307913>

- Chen, C., Dong, B., Wang, Y., Zhang, Q., Wang, B., Feng, S. & Zhu, Y. (2020). The role of *Bacillus acidophilus* in osteoporosis and its roles in proliferation and differentiation. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(11). <https://doi.org/10.1002/jcla.23471>
- Chen, P., Xu, T., Zhang, C., Tong, X., Shaikat, A., He, Y., Liu, K. & Huang, S. (2022). Effects of Probiotics and Gut Microbiota on Bone Metabolism in Chickens: A Review. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12101000>
- Chen, T. H., Chen, W. M., Hsu, K. H., Kuo, C. D. & Hung, S. C. (2007). Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(4), 913–918. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.057>
- Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E. M. & Xie, C. (2018). Osteoblast–osteoclast interactions. In *Connective Tissue Research* (Vol. 59, Issue 2, pp. 99–107). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>
- Cheng, S., Qi, X., Ma, M., Zhang, L., Cheng, B., Liang, C., Liu, L., Li, P., Kafle, O. P., Wen, Y. & Zhang, F. (2020). Assessing the Relationship Between Gut Microbiota and Bone Mineral Density. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00006>
- Chimedtseren, I., Yamahara, S., Akiyama, Y., Ito, M., Arai, Y., Gantugs, A. E., Nastume, N., Wakita, T., Hiratsuka, T., Honda, M. & Montenegro Raudales, J. L. (2023). Collagen type I-based recombinant peptide promotes bone regeneration in rat critical-size calvarial defects by enhancing osteoclast activity at late stages of healing. *Regenerative Therapy*, 24, 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2023.09.013>
- Chocholata, P., Kulda, V. & Babuska, V. (2019). Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. *Materials*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/ma12040568>
- Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., Reading, N. C., Villablanca, E. J., Wang, S., Mora, J. R., Umesaki, Y., Mathis, D., Benoist, C., Relman, D. A. & Kasper, D. L. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149(7), 1578–1593. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037>
- Cicenia, A., Santangelo, F., Gambardella, L., Pallotta, L., Iebba, V., Scirocco, A., Marignani, M., Tellan, G., Carabotti, M., Corazziari, E. S., Schippa, S. & Severi, C. (2016). Protective Role of Postbiotic Mediators Secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG Versus Lipopolysaccharide-induced Damage in Human Colonic Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S140–S144. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000681>
- Collado, M., Isolauri, E., Salminen, S. & Sanz, Y. (2009). The Impact of Probiotic on Gut Health. *Current Drug Metabolism*, 10(1), 68–78. <https://doi.org/10.2174/138920009787048437>
- Corsello, G., Carta, M., Marinello, R., Picca, M., de Marco, G., Micillo, M., Ferrara, D., Vigneri, P., Cecere, G., Ferri, P., Roggero, P., Bedogni, G., Mosca, F., Paparo, L., Nocerino, R. & Canani, R. B. (2017). Preventive effect of cow's milk fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 on common infectious diseases in children: A multicenter randomized controlled trial. *Nutrients*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/nu9070669>
- Cortés-Martín, A., Selma, M. V., Tomás-Barberán, F. A., González-Sarriás, A. & Espín, J. C. (2020). Where to Look into the Puzzle of Polyphenols and Health? The Postbiotics and Gut Microbiota Associated with Human Metabotypes. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 64, Issue 9). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900952>

- Cousin, F. J., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel, M. T., Corcos, L. & Jan, G. (2012). Milk fermented by propionibacterium freudenreichii induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031892>
- D'Amelio, P. and Sassi, F. (2016). Osteoimmunology: from mice to humans. *Bonekey Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.29>
- Dai, Z. and Koh, W. P. (2015). B-vitamins and bone health—a review of the current evidence. In *Nutrients* (Vol. 7, Issue 5, pp. 3322–3346). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu7053322>
- Das, D., Baruah, R. & Goyal, A. (2014). A food additive with prebiotic properties of an  $\alpha$ -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.029>
- de Moreno De LeBlanc, A., LeBlanc, J. G., Perdigón, G., Miyoshi, A., Langella, P., Azevedo, V. & Sesma, F. (2008). Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 57(1), 100–105. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47403-0>
- den Besten, G., Lange, K., Havinga, R., van Dijk, T. H., Gerding, A., van Eunen, K., Müller, M., Groen, A. K., Hooiveld, G. J., Bakker, B. M. & Reijngoud, D. J. (2013). Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(12), 900–910. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2013>
- Deshpande, G., Athalye-Jape, G. & Patole, S. (2018). Para-probiotics for preterm neonates The next frontier. *Nutrients*, 10(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/nu10070871>
- Devlin, A. S., Marcobal, A., Dodd, D., Nayfach, S., Plummer, N., Meyer, T., Pollard, K. S., Sonnenburg, J. L. & Fischbach, M. A. (2016). Modulation of a Circulating Uremic Solute via Rational Genetic Manipulation of the Gut Microbiota. *Cell Host and Microbe*, 20(6), 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.021>
- Dinić, M., Lukić, J., Djokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N. & Begović, J. (2017). *Lactobacillus fermentum* postbiotic-induced autophagy as potential approach for treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00594>
- Doi, K., Kobatake, R., Makihara, Y., Oki, Y., Umehara, H., Kubo, T. & Tsuga, K. (2020). The development of novel bioactive porous titanium as a bone reconstruction material. *RSC Advances*, 10(38), 22684–22690. <https://doi.org/10.1039/d0ra03202f>
- Du, Y., Guo, J. L., Wang, J., Mikos, A. G. & Zhang, S. (2019). Hierarchically designed bone scaffolds: From internal cues to external stimuli. In *Biomaterials* (Vol. 218). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119334>
- Duffuler, P., Bhullar, K. S. & Wu, J. (2024). Targeting gut microbiota in osteoporosis: impact of the microbial based functional food ingredients. *Food Science and Human Wellness*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250001>
- Einhorn, T. A. and Gerstenfeld, L. C. (2015). Fracture healing: Mechanisms and interventions. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 45–54). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>

- Elsafadi, M., Manikandan, M., Atteya, M., Hashmi, J. A., Iqbal, Z., Aldahmash, A., Alfayez, M., Kassem, M. & Mahmood, A. (2016). Characterization of Cellular and Molecular Heterogeneity of Bone Marrow Stromal Cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9378081>
- Escamilla, J., Lane, M. A. & Maitin, V. (2012). Cell-free supernatants from probiotic lactobacillus casei and lactobacillus rhamnosus GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutrition and Cancer*, 64(6), 871–878. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.700758>
- Espín, J. C., González-Sarriás, A. & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 139, pp. 82–93). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033>
- Fan, X., Li, L., Ye, Z., Zhou, Y. & Tan, W. S. (2018). Regulation of osteogenesis of human amniotic mesenchymal stem cells by sodium butyrate. *Cell Biology International*, 42(4), 457–469. <https://doi.org/10.1002/cbin.10919>
- Fan, Y. and Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 55–71). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Fei, N., Bruneau, A., Zhang, X., Wang, R., Wang, J., Rabot, S., Gérard, P., Zhao, L. & Fei, C. N. (2020). *Endotoxin Producers Overgrowing in Human Gut Microbiota as the Causative Agents for Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. <https://doi.org/10.1128/mBio.03263>
- Fei, Y., Chen, Z., Han, S., Zhang, S., Zhang, T., Lu, Y., Berglund, B., Xiao, H., Li, L. & Yao, M. (2023). Role of prebiotics in enhancing the function of next-generation probiotics in gut microbiota. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 63, Issue 8, pp. 1037–1054). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1958744>
- Fellows, R., Denizot, J., Stellato, C., Cuomo, A., Jain, P., Stoyanova, E., Balázs, S., Hajnády, Z., Liebert, A., Kazakevych, J., Blackburn, H., Corrêa, R. O., Fachi, J. L., Sato, F. T., Ribeiro, W. R., Ferreira, C. M., Perée, H., Spagnuolo, M., Mattiuz, R., ... Varga-Weisz, P. (2018). Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02651-5>
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Thomas, E. L. & Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H. & Hattori, M. (2012). Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes*, 3(5), 449–454. <https://doi.org/10.4161/gmic.21214>
- Fukunishi, T., Best, C. A., Ong, C. S., Groehl, T., Reinhardt, J., Yi, T., Miyachi, H., Zhang, H., Shinoka, T., Breuer, C. K., Johnson, J. & Hibino, N. (2018). Role of Bone Marrow Mononuclear Cell Seeding for Nanofiber Vascular Grafts. *Tissue Engineering- Part A*, 24(1–2), 135–144. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0044>

- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, *504*(7480), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Garai-Ibabe, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M. L., López, P., Corbí, A. L. & Fernández de Palencia, P. (2010). Naturally occurring 2-substituted (1,3)- $\beta$ -d-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology*, *101*(23), 9254–9263. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.050>
- García, J. R., Clark, A. Y. & García, A. J. (2016). Integrin-specific hydrogels functionalized with VEGF for vascularization and bone regeneration of critical-size bone defects. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *104*(4), 889–900. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35626>
- Garrison, J. C., Peterson, P. & Uyeki, E. M. (1989). Computer-based image analysis of cartilage differentiation in embryonic limb bud micromass cultures. *Journal of Microscopy*, *156*(3), 353–361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1989.tb02936.x>
- Geun Kim, H., Kim, N.-R., Geun Gim, M., Min Lee, J., Yeon Lee, S., Yeon Ko, M., Yun Kim, J., Hyun Han, S. & Kyun Chung, D. (2008). Lipoteichoic Acid Isolated from *Lactobacillus plantarum* Inhibits Lipopolysaccharide-Induced TNF-Production in THP-1 Cells and Endotoxin Shock in Mice 1. In *The Journal of Immunology* (Vol. 180). [www.jimmunol.org](http://www.jimmunol.org)
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K. & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *14*(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gosálbez, L. and Ramón, D. (2015). Probiotics in transition: Novel strategies. *Trends in Biotechnology*, *33*(4), 195–196. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.01.006>
- Gronowicz, G., Jacobs, E., Peng, T., Zhu, L., Hurley, M. & Kuhn, L. T. (2017). Calvarial bone regeneration is enhanced by sequential delivery of fgf-2 and bmp-2 from layer-by-layer coatings with a biomimetic calcium phosphate barrier layer. *Tissue Engineering - Part A*, *23*(23–24), 1490–1501. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0111>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. (n.d.). *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.240309797](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.240309797)
- Gurry, T. (2017). Synbiotic approaches to human health and well-being. *Microbial Biotechnology*, *10*(5), 1070–1073. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12789>
- Hamidi, M. S., Gajic-Veljanoski, O. & Cheung, A. M. (2013). Vitamin K and Bone Health. *Journal of Clinical Densitometry*, *16*(4), 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2013.08.017>
- Han, D., Wang, W., Gong, J., Ma, Y. & Li, Y. (2024). Microbiota metabolites in bone: Shaping health and Confronting disease. In *Heliyon* (Vol. 10, Issue 7). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28435>

- Hatakeyama, W., Taira, M., Sawada, T., Hoshi, M., Hachinohe, Y., Sato, H., Takafuji, K., Kihara, H., Takemoto, S. & Kondo, H. (2022). Bone Regeneration of Critical-Size Calvarial Defects in Rats Using Highly Pressed Nano-Apatite/Collagen Composites. *Materials*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/ma15093376>
- Hathaway-Schrader, J. D., Poulides, N. A., Carson, M. D., Kirkpatrick, J. E., Warner, A. J., Swanson, B. A., Taylor, E. v., Chew, M. E., Reddy, S. v., Liu, B., Westwater, C. & Novince, C. M. (2020). Specific Commensal Bacterium Critically Regulates Gut Microbiota Osteoimmunomodulatory Actions During Normal Postpubertal Skeletal Growth and Maturation. *JBMR Plus*, 4(3). <https://doi.org/10.1002/jbm4.10338>
- Hegsted, D. M. (1986). *Calcium and Osteoporosis1*. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/116/11/2316/4763224>
- Hemarajata, P. and Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 39–51. <https://doi.org/10.1177/1756283X12459294>
- Hernandez, C. J., Guss, J. D., Luna, M. & Goldring, S. R. (2016). Links Between the Microbiome and Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(9), 1638–1646. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2887>
- Hijová, E. (2024). Postbiotics as Metabolites and Their Biotherapeutic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5441. <https://doi.org/10.3390/ijms25105441>
- Hongpattarakere, T., Chertong, N., Wichienchot, S., Kolida, S. & Rastall, R. A. (2012). In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.085>
- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquin, C., Velge-Roussel, F. & Lebranchu, Y. (2008). Supernatant from Bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS ONE*, 3(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002753>
- Hoess, A., López, A., Engqvist, H., Ott, M. K. & Persson, C. (2016). Comparison of a quasi-dynamic and a static extraction method for the cytotoxic evaluation of acrylic bone cements. *Materials Science and Engineering C*, 62, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.048>
- Huang, C. and Ogawa, R. (2010). Mechanotransduction in bone repair and regeneration. In *FASEB Journal* (Vol. 24, Issue 10, pp. 3625–3632). FASEB. <https://doi.org/10.1096/fj.10-157370>
- Huang, Y., Chen, X., Che, J., Zhan, Q., Ji, J., Fan, Y. & Hanna, J. H. (2019). Shear Stress Promotes Arterial Endothelium-Oriented Differentiation of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells.
- Ibrahim, I., Syamala, S., Ayariga, J. A., Xu, J., Robertson, B. K., Meenakshisundaram, S. & Ajayi, O. S. (2022). Modulatory Effect of Gut Microbiota on the Gut-Brain, Gut-Bone Axes, and the Impact of Cannabinoids. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12121247>

- Inoue, S., Fujikawa, K., Matsuki-Fukushima, M. & Nakamura, M. (2020). Repair processes of flat bones formed via intramembranous versus endochondral ossification. *Journal of Oral Biosciences*, 62(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.job.2020.01.007>
- Irving, A. T., Mimuro, H., Kufer, T. A., Lo, C., Wheeler, R., Turner, L. J., Thomas, B. J., Malosse, C., Gantier, M. P., Casillas, L. N., Votta, B. J., Bertin, J., Boneca, I. G., Sasakawa, C., Philpott, D. J., Ferrero, R. L. & Kaparakis-Liaskos, M. (2014). The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. *Cell Host and Microbe*, 15(5), 623–635. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.001>
- Iwami K. and Moriyama T. (1993). Effects of short chain fatty acid, sodium butyrate, on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Int J Biochem*. Nov;25(11):1631-5. doi: 10.1016/0020-711x(93)90522-g. PMID: 8288032.
- Izuddin, W. I., Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L. & Samsudin, A. A. (2020). Dietary postbiotic lactobacillus plantarum improves serum and ruminal antioxidant activity and upregulates hepatic antioxidant enzymes and ruminal barrier function in post-weaning lambs. *Antioxidants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/antiox9030250>
- Jensen, G. S., Benson, K. F., Carter, S. G. & Endres, J. R. (2010). GanedenBC30™ cell wall and metabolites: Anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC Immunology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-15>
- Kaji, R., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Nanno, M. & Shida, K. (2010). Bacterial Teichoic Acids Reverse Predominant IL-12 Production Induced by Certain Lactobacillus Strains into Predominant IL-10 Production via TLR2-Dependent ERK Activation in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3505–3513. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901569>
- Karieb, S. and Fox, S. W. (2013). Suppression of T cell-induced osteoclast formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(4), 619–624. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.140>
- Kataria, J., Li, N., Wynn, J. L. & Neu, J. (2009). Probiotic microbes: Do they need to be alive to be beneficial? *Nutrition Reviews*, 67(9), 546–550. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00226.x>
- Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Suzuki, N., Iida, T., Morozumi, A., Ochiai, K. & Maeno, M. (2008). Sodium butyrate stimulates mineralized nodule formation and osteoprotegerin expression by human osteoblasts. *Archives of Oral Biology*, 53(10), 903–909. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.02.016>
- Khalil, E. S., Manap, M. Y. A., Mustafa, S., Alhelli, A. M. & Shokryazdan, P. (2018). Probiotic properties of exopolysaccharide-producing lactobacillus strains isolated from tempoyak. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020398>
- Khodaii, Z., Mohammad, S., Ghaderian, H., Mahboomeh, M.N. (2017). *I IJ JM MC CM M Probiotic Bacteria and their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines from Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) Invasion.*
- Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Kobayashi, M., Sasaki, K., Kurisaki, J. I. & Mizumachi, K. (2007). Anti-ageing effect of a lactococcal strain: Analysis using senescence-accelerated mice. *British Journal of Nutrition*, 98(6), 1178–1186. <https://doi.org/10.1017/S0007114507787469>

- Koh, A., de Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- Konstantinov, S. R., Kuipers, E. J. & Peppelenbosch, M. P. (2013). Functional genomic analyses of the gut microbiota for crc screening. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(12), 741–745. <https://doi.org/10.1038/rgastro.2013.178>
- Koons, G. L., Diba, M. & Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 5, Issue 8, pp. 584–603). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>
- Kuvshinova, E. A., Petrakova, N. V., Nikitina, Y. O., Sviridova, I. K., Akhmedova, S. A., Kirsanova, V. A., Karalkin, P. A., Komlev, V. S., Sergeeva, N. S., & Kaprin, A. D. (2023). Functionalization of Octacalcium Phosphate Bone Graft with Cisplatin and Zoledronic Acid: Physicochemical and Bioactive Properties. *International journal of molecular sciences*, 24(14), 11633. <https://doi.org/10.3390/ijms241411633>
- Lahtinen, S. J. (2012). Probiotic viability – does it matter? *Microbial Ecology in Health & Disease*, 23(0), 10–14. <https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18567>
- LeBlanc, J. G., del Carmen, S., Miyoshi, A., Azevedo, V., Sesma, F., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., Watterlot, L., Perdigon, G. & de Moreno de LeBlanc, A. (2011). Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. *Journal of Biotechnology*, 151(3), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.11.008>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D. & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 160–168). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lee, C., Kim, B. G., Kim, J. H., Chun, J., Im, J. P. & Kim, J. S. (2017). Sodium butyrate inhibits the NF-kappa B signaling pathway and histone deacetylation, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner. *International Immunopharmacology*, 51, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.023>
- Li, J. Y., Chassaing, B., Tyagi, A. M., Vaccaro, C., Luo, T., Adams, J., Darby, T. M., Weitzmann, M. N., Mulle, J. G., Gewirtz, A. T., Jones, R. M. & Pacifici, R. (2016). Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *Journal of Clinical Investigation*, 126(6), 2049–2063. <https://doi.org/10.1172/JCI86062>
- Li, Y., Toraldo, G., Li, A., Yang, X., Zhang, H., Qian, W. P. & Weitzmann, M. N. (2007). B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*, 109(9), 3839–3848. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-037994>
- Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X. & Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.053>
- Lin, Y., Umabayashi, M., Abdallah, M. N., Dong, G., Roskies, M. G., Zhao, Y. F., Murshed, M., Zhang, Z. & Tran, S. D. (2019). Combination of polyetherketoneketone scaffold and human mesenchymal stem cells from temporomandibular joint synovial fluid enhances bone regeneration. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36778-2>
- Liu, Y., Hou, Y., Wang, G., Zheng, X., & Hao, H. (2020). Gut Microbial Metabolites of Aromatic Amino Acids as Signals in Host–Microbe Interplay. In *Trends in Endocrinology and*

- Liu, Y., Miao, Y. L., Qin, F., Cao, C., Yu, X. L., Wu, Y. H., Wang, T. L., Xu, R. G., Zhao, L., Wu, F., Zhang, Z. C., Yang, J. M., Yang, Y., Xie, X., Zhang, L. M. & Deng, F. L. (2019). Electrospun poly (Aspartic acid)-modified zein nanofibers for promoting bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9497–9512. <https://doi.org/10.2147/IJN.S224265>
- Lucas, S., Omata, Y., Hofmann, J., Böttcher, M., Iljazovic, A., Sarter, K., Albrecht, O., Schulz, O., Krishnacoumar, B., Krönke, G., Herrmann, M., Mougiakakos, D., Strowig, T., Schett, G. & Zaiss, M. M. (2018). Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02490-4>
- Lührs, H., Gerke, T., Müller, J. G., Melcher, R., Schaubert, J., Boxberger, F., Scheppach, W., Menzel, T. & Butyrate, M. T. (2002). *Butyrate Inhibits NF- $\mu$ B Activation in Lamina Propria Macrophages of Patients with Ulcerative Colitis*.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. & Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. In *BioFactors* (Vol. 22). IOS Press.
- Makino, S., Sato, A., Goto, A., Nakamura, M., Ogawa, M., Chiba, Y., Hemmi, J., Kano, H., Takeda, K., Okumura, K. & Asami, Y. (2016). Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgarius* OLL1073R-1. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 915–923. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10376>
- Malagón-rojas, J. N., Mantziari, A., Salminen, S. & Szajewska, H. (2020). Postbiotics for preventing and treating common infectious diseases in children: A systematic review. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12020389>
- Manolagas, S. C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. In *Endocrine Reviews* (Vol. 31, Issue 3, pp. 266–300). <https://doi.org/10.1210/er.2009-0024>
- Manzini, B. M., Machado, L. M. R., Noritomi, P. Y. & da Silva, J. V. L. (2021). Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. In *Journal of Biosciences* (Vol. 46, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00122-6>
- Martin, M., Sansalone, V., Cooper, D. M. L., Forwood, M. R. & Pivonka, P. (2019). Mechanobiological osteocyte feedback drives mechanostat regulation of bone in a multiscale computational model. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 18(5), 1475–1496. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01158-w>
- McCabe Laura, Britton, R. A. & Parameswaran Narayanan. (2015). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0292-x>.Prebiotic
- McLaughlin, K. I., Milne, T. J., Zafar, S., Zanicotti, D. G., Cullinan, M. P., Seymour, G. J. & Coates, D. E. (2020). The in vitro effect of VEGF receptor inhibition on primary alveolar osteoblast nodule formation. *Australian Dental Journal*, 65(3), 196–204. <https://doi.org/10.1111/adj.12752>

- Mineo, H., Hara, H. & Tomita, F. (2001). Short-chain fatty acids enhance diffusional Ca transport in the epithelium of the rat cecum and colon. In *Life Sciences* (Vol. 69).
- Mizuno, H., Itoi, Y., Kawahara, S., Ogawa, R., Akaishi, S. & Hyakusoku, H. (2008). In vivo adipose tissue regeneration by adipose-derived stromal cells isolated from GFP transgenic mice. *Cells Tissues Organs*, 187(3), 177–185. <https://doi.org/10.1159/000110805>
- Mohammad, M. A., Molloy, A., Scott, J. & Hussein, L. (2006). Plasma cobalamin and folate and their metabolic markers methylmalonic acid and total homocysteine among Egyptian children before and after nutritional supplementation with the probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt matrix. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(7–8), 470–480. <https://doi.org/10.1080/09637480600968735>
- Montalbano, G., Borciani, G., Pontremoli, C., Ciapetti, G., Mattioli-Belmonte, M., Fiorilli, S. & Vitale-Brovarone, C. (2019). Development and biocompatibility of collagen-based composites enriched with nanoparticles of strontium containing mesoporous glass. *Materials*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/ma12223719>.
- Montazeri-Najafabady, N., Ghasemi, Y., Dabbaghmanesh, M. H., Ashoori, Y., Talezadeh, P., Koohpeyma, F., Abootalebi, S. N. & Gholami, A. (2021). Exploring the bone sparing effects of postbiotics in the post-menopausal rat model. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03327-w>
- Morifuji, M., Ichikawa, S., Kitade, M., Fukasawa, T., Asami, Y., Manabe, Y. & Sugawara, T. (2020). Exopolysaccharides from milk fermented by lactic acid bacteria enhance dietary carotenoid bioavailability in humans in a randomized crossover trial and in rats. *American Journal of Clinical Nutrition*, 111(4), 903–914. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa020>
- Moser, S. C. and van der Eerden, B. C. J. (2019). Osteocalcin — A versatile bone-derived hormone. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00794>
- Nakamura, F., Ishida, Y., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., Sakai, M., Goto, T., Kawada, T. & Fujiwara, S. (2016). Fragmented Lactic Acid Bacterial Cells Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Ameliorate Dyslipidemia in Obese Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2549–2559. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05827>
- Nakashima, T. and Takayanagi, H. (2009). Osteoimmunology: Crosstalk between the immune and bone systems. *Journal of Clinical Immunology*, 29(5), 555–567. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9316-6>
- Ni, J. J., Yang, X. L., Zhang, H., Xu, Q., Wei, X. T., Feng, G. J., Zhao, M., Pei, Y. F. & Zhang, L. (2021). Assessing causal relationship from gut microbiota to heel bone mineral density. *Bone*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115652>
- Nocerino, R., Paparo, L., Terrin, G., Pezzella, V., Amoroso, A., Cosenza, L., Cecere, G., de Marco, G., Micillo, M., Albano, F., Nugnes, R., Ferri, P., Ciccarelli, G., Giaccio, G., Spadaro, R., Maddalena, Y., Berni Canani, F. & Berni Canani, R. (2017). Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 36(1), 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.12.004>

- Novais, A., Chatzopoulou, E., Chaussain, C. & Gorin, C. (2021). The potential of fgf-2 in craniofacial bone tissue engineering: A review. In *Cells* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10040932>
- Ohlsson, C. and Sjögren, K. (2015). Effects of the gut microbiota on bone mass. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(2), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.11.004>
- Omeroglou E. (2021). *Dental plak gideriminde mikrobiyota kaynaklı post-biyotik mediatörlerin etkinliğinin değerlendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Ornitz, D. M. and Marie, P. J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. In *Genes and Development* (Vol. 16, Issue 12, pp. 1446–1465). <https://doi.org/10.1101/gad.990702>
- Pacifici, R. (2008). Estrogen deficiency, T cells and bone loss. In *Cellular Immunology* (Vol. 252, Issues 1–2, pp. 68–80). <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.06.008>
- Palacios, C. (2006). The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 621–628. <https://doi.org/10.1080/10408390500466174>
- Paradis, F. H. and Hales, B. F. (2013). Exposure to valproic acid inhibits chondrogenesis and osteogenesis in mid-organogenesis mouse limbs. *Toxicological Sciences*, 131(1), 234–241. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs292>
- Parfitt, A. M. (2002). *Misconceptions (2): Turnover Is Always Higher in Cancellous Than in Cortical Bone.*
- Patel, Z. S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J. A., Wong, M. E. K. & Mikos, A. G. (2008). Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*, 43(5), 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.06.019>
- Piqué, N., Berlanga, M. & Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: An overview. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20102534>
- Pirozzi, C., Francisco, V., Guida, F. di, Gómez, R., Lago, F., Pino, J., Meli, R. & Gualillo, O. (2018). Butyrate modulates inflammation in chondrocytes via GPR43 receptor. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(1), 228–243. <https://doi.org/10.1159/000495203>
- Quach, D. and Britton, R. A. (2017). Gut Microbiota and Bone Health. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1033, pp. 47–58). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-66653-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66653-2_4)
- Rahman, M., Kukita, A., Kukita, T., Shobuike, T., Nakamura, T., & Kohashi, O. (2003). Two histone deacetylase inhibitors, trichostatin A and sodium butyrate, suppress differentiation into osteoclasts but not into macrophages. *Blood*, 101(9), 3451–3459. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2622>
- Raina, D. B., Širka, A., Qayoom, I., Teotia, A. K., Liu, Y., Tarasevicius, S., Tanner, K. E., Isaksson, H., Kumar, A., Tägil, M. & Lidgren, L. (2020). Long-term response to a bioactive biphasic

biomaterial in the femoral neck of osteoporotic rats. *Tissue Engineering - Part A*, 26(19–20), 1042–1051. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0018>

- Reid, G. (2016). Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 17–25). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.12.001>.
- Richter, B. and Faul, C. (2018). FGF23 actions on target tissues-with and without Klotho. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00189>
- Rigo-Adrover, M. D. M., Knipping, K., Garssen, J., van Limpt, K., Knol, J., Franch, À., Castell, M., Rodríguez-Lagunas, M. J. & Pérez-Cano, F. J. (2019). Prevention of rotavirus diarrhea in suckling rats by a specific fermented milk concentrate with prebiotic mixture. *Nutrients*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/nu11010189>
- Rios-Arce, N. D., Schepper, J. D., Dagenais, A., Schaefer, L., Daly-Seiler, C. S., Gardinier, J. D., Britton, R. A., McCabe, L. R. & Parameswaran, N. (2020). Post-antibiotic gut dysbiosis-induced trabecular bone loss is dependent on lymphocytes. *Bone*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115269>
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I. & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 78, pp. 1246–1262). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>
- Salamanna, F., Maglio, M., Borsari, V., Giavaresi, G., Aldini, N. N. & Fini, M. (2016). Peripheral Blood Mononuclear Cells Spontaneous Osteoclastogenesis: Mechanisms Driving the Process and Clinical Relevance in Skeletal Disease. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 231, Issue 3, pp. 521–530). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.25134>
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H. & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 9, pp. 649–667). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Sandoval, D. A. and D'alessio, D. A. (2015). Physiology of Proglucagon Peptides: Role of Glucagon and GLP-1 in Health and Disease. *Physiol Rev*, 95, 513–548. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2014>.-The
- Sas, A., Helgason, B., Ferguson, S. J. & van Lenthe, G. H. (2021). Mechanical and morphological characterization of PMMA/bone composites in human femoral heads. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104247>
- Schwarzer, M., Srutkova, D., Hermanova, P., Martino, M. E., Balmand, S., Hudcovic, T., Heddi, A., Rieusset, J., Kozakova, H., Vidal, H. & Leulier, F. (2016). *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. 783(2006).

- Sjögren, K., Engdahl, C., Henning, P., Lerner, U. H., Tremaroli, V., Lagerquist, M. K., Bäckhed, F. & Ohlsson, C. (2012). The gut microbiota regulates bone mass in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(6), 1357–1367. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1588>
- Scheppach, W. (1994). Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35(1 SUPPL.), 35–39. [https://doi.org/10.1136/gut.35.1\\_Suppl.S35](https://doi.org/10.1136/gut.35.1_Suppl.S35)
- Schepper, J. D., Collins, F. L., Rios-Arce, N. D., Raetz, S., Schaefer, L., Gardinier, J. D., Britton, R. A., Parameswaran, N. & McCabe, L. R. (2019). Probiotic *Lactobacillus reuteri* Prevents Postantibiotic Bone Loss by Reducing Intestinal Dysbiosis and Preventing Barrier Disruption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(4), 681–698. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3635>
- Schroeder, T. M. and Westendorf, J. J. (2005). Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(12), 2254–2263. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050813>
- Shang, F., Yu, Y., Liu, S., Ming, L., Zhang, Y., Zhou, Z., Zhao, J. & Jin, Y. (2021). Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. In *Bioactive Materials* (Vol. 6, Issue 3, pp. 666–683). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.014>
- Sheykhasan M, Wong JKL, Seifalian AM (2019). Human Adipose-Derived Stem Cells with Great Therapeutic Potential. *Curr Stem Cell Res Ther.* 14(7):532-548. doi: 10.2174/1574888X14666190411121528. PMID: 30973112.
- Siddiqui, J. A. and Partridge, N. C. (2016). Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. In *Physiology* (Vol. 31, Issue 3, pp. 233–245). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physiol.00061.2014>
- Singh, J., Metrani, R., Shivanagoudra, S. R., Jayaprakasha, G. K. & Patil, B. S. (2019). Review on Bile Acids: Effects of the Gut Microbiome, Interactions with Dietary Fiber, and Alterations in the Bioaccessibility of Bioactive Compounds. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 67, Issue 33, pp. 9124–9138). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07306>
- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K. & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocols*, 7(10), 1918–1929. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113>
- Sui, B., Chen, C., Kou, X., Li, B., Xuan, K., Shi, S. & Jin, Y. (2019). Pulp Stem Cell–Mediated Functional Pulp Regeneration. In *Journal of Dental Research* (Vol. 98, Issue 1, pp. 27–35). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/0022034518808754>.
- Sweeney, T. M., Opperman, L.A., Persing, J.A. & Ogle, R.C. (1995). *Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels*. *J. Neurosurgery*, Volume 83, 710–715. <https://doi.org/10.3171/jns.1995.83.4.0710>
- Tanaka, T., Komaki, H., Chazono, M., Kitasato, S., Kakuta, A., Akiyama, S. & Marumo, K. (2017). Recherche fondamentale et application clinique du bêta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP). In *Morphologie* (Vol. 101, Issue 334, pp. 164–172). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2017.03.002>

- Tang, M., Chen, W., Weir, M. D., Thein-Han, W. & Xu, H. H. K. (2012). Human embryonic stem cell encapsulation in alginate microbeads in macroporous calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 8(9), 3436–3445. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.016>
- Taverniti, V. and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. & Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease CLINICAL RESEARCH. *World J Gastroenterol*, 13(20), 2826–2832. [www.wjgnet.comhttp://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2826.asp](http://www.wjgnet.comhttp://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2826.asp)
- Tomusiak-Plebanek, A., Heczko, P., Skowron, B., Baranowska, A., Okoń, K., Thor, P. J. & Strus, M. (2018). Lactobacilli with superoxide dismutase-like or catalase activity are more effective in alleviating inflammation in an inflammatory bowel disease mouse model. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3221–3233. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S164559>
- Toosi, S. and Behravan, J. (2020). Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides. In *BioFactors* (Vol. 46, Issue 3, pp. 326–340). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/biof.1598>
- Tousen, Y., Ezaki, J., Fujii, Y., Ueno, T., Nishimuta, M. & Ishimi, Y. (2011). Natural S-equol decreases bone resorption in postmenopausal, non-equol-producing Japanese women: A pilot randomized, placebo-controlled trial. *Menopause*, 18(5), 563–574. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3181f85aa7>
- Tyagi, A. M., Darby, T. M., Hsu, E., Yu, M., Pal, S., Dar, H., Li, J. Y., Adams, J., Jones, R. M. & Pacifici, R. (2021). The gut microbiota is a transmissible determinant of skeletal maturation. *ELife*, 10, 1–21. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.64237>
- Uchida, M., Ishii, I., Inoue, C., Akisato, Y., Watanabe, K., Hosoyama, S., Toida, T., Ariyoshi, N. & Kitada, M. (n.d.). *Kefiran Reduces Atherosclerosis in Rabbits Fed a High Cholesterol Diet*. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* Volume 17 No 9, 980-988. <https://doi.org/10.5551/jat.481>
- Vaca-González, J. J., Moncayo-Donoso, M., Guevara, J. M., Hata, Y., Shefelbine, S. J. & Garzón-Alvarado, D. A. (2018). Mechanobiological modeling of endochondral ossification: an experimental and computational analysis. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 17(3), 853–875. <https://doi.org/10.1007/s10237-017-0997-0>
- Van der Aa, L. B., van Aalderen, W. M. C., Heymans, H. S. A., Henk Sillevius Smitt, J., Nauta, A. J., Knippels, L. M. J., ben Amor, K. & Sprickelman, A. B. (2011). Synbiotics prevent asthma-like symptoms in infants with atopic dermatitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66(2), 170–177. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02416.x>
- Vogel, R. F., Pavlovic, M., Ehrmann, M. A., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Böcker, G. & Liebl, W. (2011). Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microbial Cell Factories*, 10(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S6>

- Wallace, T. C., Marzorati, M., Spence, L., Weaver, C. M. & Williamson, P. S. (2017). New Frontiers in Fibers: Innovative and Emerging Research on the Gut Microbiome and Bone Health. In *Journal of the American College of Nutrition* (Vol. 36, Issue 3, pp. 218–222). Routledge. <https://doi.org/10.1080/07315724.2016.1257961>
- Wallimann, A., Magrath, W., Thompson, K., Moriarty, T. F., Richards, R. G., Akdis, C. A., O'mahony, L. & Hernandez, C. J. (2021). Gut microbial-derived short-chain fatty acids and bone: A potential role in fracture healing. *European Cells and Materials*, 41, 454–470. <https://doi.org/10.22203/eCM.v041a29>
- Wang, C., Xu, D., Li, S., Yi, C., Zhang, X., He, Y. & Yu, D. (2020). Effect of Pore Size on the Physicochemical Properties and Osteogenesis of Ti6Al4V Porous Scaffolds with Bionic Structure. *ACS Omega*, 5(44), 28684–28692. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03824>
- Wang, Z., MacLeod, D. T. & di Nardo, A. (2012). Commensal Bacteria Lipoteichoic Acid Increases Skin Mast Cell Antimicrobial Activity against Vaccinia Viruses. *The Journal of Immunology*, 189(4), 1551–1558. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200471>
- Wang, J., Wu, T., Fang, X., Min, W. & Yang, Z. (2018). Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* JLK0142 isolated from fermented dairy tofu. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 985–993. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.099>
- Weaver, C. M., Martin, B. R., Nakatsu, C. H., Armstrong, A. P., Clavijo, A., McCabe, L. D., McCabe, G. P., Duignan, S., Schoterman, M. H. C. & van den Heuvel, E. G. H. M. (2011). Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6501–6510. <https://doi.org/10.1021/jf2009777>
- Wegh, C. A. M., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G. & Belzer, C. (2019). Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>
- Williams, S., Wakisaka, A., Zeng, Q. Q., Barnes, J., Martin, G., Wechter, W. J. & Liang, C. T. (1996). Minocycline Prevents the Decrease in Bone Mineral Density and Trabecular Bone in Ovariectomized Aged Rats. In *Bone* (Vol. 19, Issue 6).
- Xia, B., Shi, X. C., Xie, B. C., Zhu, M. Q., Chen, Y., Chu, X. Y., Cai, G. H., Liu, M., Yang, S. Z., Mitchell, G. A., Pang, W. J. & Wu, J. W. (2020). Urolithin A exerts antiobesity effects through enhancing adipose tissue thermogenesis in mice. *PLoS Biology*, 18(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000688>
- Xiao, W., Zhang, D., Chen, X., Yuan, C. & Xue, L. (2016). Osteogenesis effect of guided bone regeneration combined with alveolar cleft grafting: assessment by cone beam computed tomography. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. <https://doi.org/10.1016/Clinical>
- Xiu, L., Zhang, H., Hu, Z., Liang, Y., Guo, S., Yang, M., Du, R. & Wang, X. (2018). Immunostimulatory activity of exopolysaccharides from probiotic *Lactobacillus casei* WXD030 strain as a novel adjuvant in vitro and in vivo. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 1086–1105. <https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1513994>
- Xu, D., Song, W., Zhang, J., Liu, Y., Lu, Y., Zhang, X., Liu, Q., Yuan, T. & Liu, R. (2021). Osteogenic effect of polymethyl methacrylate bone cement with surface modification of

lactoferrin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.04.006>


- Yamahara, S., Montenegro Raudales, J. L., Akiyama, Y., Ito, M., Chimedtseren, I., Arai, Y., Wakita, T., Hiratsuka, T., Miyazawa, K., Goto, S. & Honda, M. (2022). Appropriate pore size for bone formation potential of porous collagen type I-based recombinant peptide. *Regenerative Therapy*, 21, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.08.001>
- Yan, J., Herzog, J. W., Tsang, K., Brennan, C. A., Bower, M. A., Garrett, W. S., Sartor, B. R., Aliprantis, A. O. & Charles, J. F. (2016). Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(47), E7554–E7563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607235113>
- Yoshikata, R., Myint, K. Z. Y. & Ohta, H. (2018). Effects of equol supplement on bone and cardiovascular parameters in middle-aged Japanese women: A prospective observational study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 24(7), 701–708. <https://doi.org/10.1089/acm.2018.0050>
- Young, D. A., Lakey, R. L., Pennington, C. J., Jones, D., Kevorkian, L., Edwards, D. R., Cawston, T. E. & Clark, I. M. (2005). Open Access Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Research & Therapy*, 7, 503–512. <https://doi.org/10.1186/ar1702>
- Yousefi, A. M., James, P. F., Akbarzadeh, R., Subramanian, A., Flavin, C. & Oudadesse, H. (2016). Prospect of stem cells in bone tissue engineering: A review. In *Stem Cells International* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/6180487>
- Yun, Y. R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J. H., Shin, U. S. & Kim, H. W. (2010). Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. In *Journal of Tissue Engineering* (Vol. 1, Issue 1, pp. 1–18). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.4061/2010/218142>
- Zadeh, M., Khan, M. W., Goh, Y. J., Selle, K., Owen, J. L., Klaenhammer, T. & Mohamadzadeh, M. (2012). Induction of intestinal pro-inflammatory immune responses by lipoteichoic acid. *Journal of Inflammation*, 9. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-7>
- Zafar, T. A., Weaver, C. M., Zhao, Y., Martin, B. R. & Wastney, M. E. (2004). *Nutrient Metabolism-Research Communication Nondigestible Oligosaccharides Increase Calcium Absorption and Suppress Bone Resorption in Ovariectomized Rats 1*.
- Zaiss, M. M., Jones, R. M., Schett, G. & Pacifici, R. (2019). The gut-bone axis: How bacterial metabolites bridge the distance. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 129, Issue 8, pp. 3018–3028). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI128521>
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G. & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), S168–S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>
- Zhang, D. Z., Xiao, W. L., Zhou, R., Xue, L. F. & Ma, L. (2015). Evaluation of bone height and bone mineral density using cone beam computed tomography after secondary bone graft in alveolar cleft. *Journal of Craniofacial Surgery*, 26(5), 1463–1466. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000001766>

Zhao, X., Liu, S., Li, S., Jiang, W., Wang, J., Xiao, J., Chen, T., Ma, J., Khan, M. Z., Wang, W., Li, M., Li, S. & Cao, Z. (2024). Unlocking the power of postbiotics: A revolutionary approach to nutrition for humans and animals. In *Cell Metabolism* (Vol. 36, Issue 4, pp. 725–744). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.03.004>



## EKLER

### Ek-1 Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI**

**TOPLANTI TARİHİ** : 14/07/2021  
**TOPLANTI NO** : 2021-13  
**DOSYA NO** : 2021-72  
**KARAR NO** : 2021-13-107

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ömer BEŞALTI'nın yaptığı; araştırmacı olarak Doç. Dr. Fadime KIRAN ve Ali Furkan ERDOĞAN'ın katıldığı "Rat Kalvaryumu Kritik Boyutlu Defekt Modelinde Köpek ve Kedi Mikrobiyota Kaynaklı Postbiyotiklerin Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzun 16/06/2021 tarihli toplantısında alınan 2021-11-88 sayılı kararı uyarınca düzeltilmiş şekli ile yeniden değerlendirilmiş ve Üniversite Senatosununun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre çalışmanın aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan  
Hayvan Sayısı : 64  
Geçerlilik Süresi : 01/09/2021-01/09/2023

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 60 40 / 2183 Faks : 0 (312) 212 60 49