

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİNLİĞİNDE DONÖRÜN,
TROMBOSİT SAYISININ VE KONSANTRASYONUN ÖNEMİNİN
FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

Dr.İstemihan ÖZTÜRK

TEMMUZ-2015

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİNLİĞİNDE DONÖRÜN,
TROMBOSİT SAYISININ VE KONSANTRASYONUN ÖNEMİNİN
FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

Hazırlayan

Dr.İstemihan ÖZTÜRK

Danışman

Prof.Dr. Metin GÖRGÜ

Temmuz-2015

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA,

İstemihan ÖZTÜRK'e ait “**Trombositten Zengin Plazmanın Etkinliğinde Donörün, Trombosit Sayısının ve Konsantrasyonun Öneminin Fibroblast Hücre Kültürü Üzerinde İncelenmesi**” adlı çalışma, jürimiz tarafından Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

30/07/2015

Akademik Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye Prof. Dr. Metin Görgü (Tez Danışmanı)

.....

Üye Yrd. Doç. Dr. Cengiz Işık

.....

Üye Yrd. Doç. Dr. Barış Yiğit

.....

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Hasan Koçoğlu

Tıp Fakültesi Dekanı

Uzmanlık tezi olarak sunduğum, “**Trombositten Zengin Plazmanın Etkinliğinde Donörün, Trombosit Sayısının ve Konsantrasyonun Öneminin Fibroblast Hücre Kültürü Üzerinde İncelenmesi**” başlıklı çalışmanın yazılmasında, bilimsel ve etik kurallara uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda atıfta bulunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin tamamının ya da bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

30/07/2015

İmza

İstemihan ÖZTÜRK

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda örnek aldığım, klinik ve cerrahi deneyiminin yanı sıra, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi etik ve kültürünü bana yansıtan, hayatı da öğreten, babam gibi sevdiğim, sonsuz saygı ve sevgi duyduğum büyüğüm, hocam Prof. Dr. Metin Görgü'ye,

İyi bir plastik cerrah olabilmem için uzmanlık eğitimim sırasında bilgi, davranış ve tecrübeleri ile büyük emek veren hocalarım, Doç. Dr. Furkan E. Karabekmez, Doç. Dr. Kaan Gideroğlu ve Doç. Dr. Dilek Şenen'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Dr.İbrahim Sağlam, Dr. Ali Gökkaya, Dr. F. Burak Efeoğlu, Dr. Şerif Yavuz'a,

Tez çalışmalarımda hiç unutmayacağım özel desteklerinden dolayı kardeşlerim dediğim Dr. Jehat Kızıllan, Dr.Ertuğrul Karanfil'e

Bugüne kadar çalıştığım ve hali hazırda çalışmakta olduğum klinik çalışanlarına,

Deneyisel çalışmalardaki desteğinden dolayı AİBÜ Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Dr.Muhsine Zeynep Yavuz'a,

Hayatımın her döneminde emeği ve desteği ile yanımda olan sevgili annem, babam ve kardeşime,

Yol arkadaşım, ayakta durma gücüm, sonsuz sevgi ve desteğini hep hissettiğim, canım eşim Aynur Öztürk'e, prenseslerim Şevval ve Zeynep'e

TEŞEKKÜR EDERİM

ÖZET

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİNLİĞİNDE DONÖRÜN, TROMBOSİT SAYISININ VE KONSANTRASYONUN ÖNEMİNİN FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

İstemihan ÖZTÜRK

Uzmanlık Tezi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Metin GÖRGÜ

Bolu, Temmuz 2015.

Trombositten Zengin Plazma (TZP) günümüzde Kardiyovasküler Cerrahi, Ortopedi, Üroloji, Maksillofasyal Cerrahi, Diş Hekimliği, Spor Hekimliği, Estetik ve Plastik Cerrahi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu kadar geniş kullanım alanı olan TZP uygulamaları ile ilgili etkinlik, standardizasyon, hazırlama şekilleri adına pek çok çalışma devam etmektedir. Çalışmada amacımız; TZP'nin iki farklı donörden hazırlanıp aynı konsantrasyonlarda uygulandığında fibroblast hücre kültürüne etkilerinin ne olacağını incelemek oldu. Bu amaçla iki farklı donörden alınan tam kanlar ile çift aşama santrifüj yaparak TZP'ler elde ettik. TZP'leri iki donörde de 4 farklı gruba bölerek, farklı dilüsyon oranlarında toplamda 8 grup fibroblast hücre kültürüne uyguladık (J1, J2, J3, J-PPP, E1, E2, E3, E-PPP). Ayrıca iki donör için fibroblast hücresi içermeyen TZP grupları oluşturuldu (J1ext, J2ext, J3ext, E1ext, E2ext, E3ext). Çalışmada süreyi 24 saat olarak uyguladık.

Bulguları yorumlarken; fibroblast hücre kültürleri'nde mitotik aktivite artışını ve kültürlerde "Fibroblast Growth Faktör (FGF)", "Insulin Like Growth Faktör (IGF)", "Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF)", "Transforme Growth Faktör (TGF)", "Platelet Derived Growth Faktör (PDGF-AB)" düzeylerinin ölçümlerini ve bu düzeylerin TZP konsantrasyonları ile korelasyonunun olup olmadığını değerlendirdik.

Çalışma sonunda; J-ppp ve E-ppp grupları hariç diğer tüm gruplarda fibroblast hücre kültürlerinde mitotik aktivitenin, diğer bir deyişle proliferasyonun kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığını belirledik. J-ppp ve E-ppp grupları trombosit konsantrasyonu açısından fakir gruplar olduğundan proliferasyon artışı kontrol grubuna göre anlamlı olmadı. Büyüme faktör düzeyleri incelendiğinde; TZP konsantrasyon artışı ile korelasyonu olan büyüme faktörünün PDGF-AB olduğunu gördük. Diğer büyüme faktör düzeylerinin konsantrasyon artışı ile korelasyonu saptanmamıştır.

TZP; kolay elde edilebilen, yan etki profili düşük, otolog bir kan ürünüdür. Plastik Cerrahi alanında özellikle yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Yara iyileşmesinin kilit hücrelerinden olan trombositleri ve büyüme faktörlerini yüksek konsantrasyonda içermektedir. Çalışmamızda TZP'nin fibroblast hücrelerinde proliferasyonu arttırdığını ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik. PDGF-AB düzeylerinin TZP'de konsantrasyon artışı ile korelasyonunun olduğunu gördük. İki farklı donörden hazırladığımız TZP'lerin aynı konsantrasyonlarda birbirine benzer etkiler gösterdiğini gördük. Bu bize TZP etkinliğini değerlendirmede; konsantrasyon oranının trombosit sayısından daha belirleyici olduğunu düşündürdü. Ancak yinede çalışmamızın, kendi TZP'sini hazırlayanlara referans olabilmesi, etkinliğin daha da iyi açıklanabilmesi için detaylandırılması ve ileriye götürülmesi gereklidir.

Anahtar Kelimeler : Trombositten Zengin Plazma, Fibroblast Hücre Kültürü, TZP Standardizasyon, TZP Artan Dozlar

ABSTRACT

Platelet rich plasma (PRP) is used at widely varied branches such as cardiovascular surgery, orthopedics, urology, maxillofacial surgery, dentistry, sports medicine, plastic surgery right now. Due to having such a broad spectrum of usage, researches for efficiency, standardization and preparation of PRP are still going on for the moment. In this study, our aim was to prepare PRPs from two different donors and apply it to fibroblast cell cultures at the same concentrations to see its effects. For this purpose we took whole blood samples from two different donors and prepared the PRPs with a two staged centrifuge. By dividing each sample to four different groups with different concentrated PRPs, we were able apply PRPs to eight different cell cultures (J1, J2, J3, J-PPP, E1, E2, E3, E-PPP). Furthermore for both donors cell cultures without PRPs were established (J1ext, J2ext, J3ext, E1ext, E2ext, E3ext). We applied the time as 24 hours for our study. While interpreting the results, we have considered the increase in mitotic activity, measurement of the levels of “Fibroblast Growth Factor (FGF)”, “Insulin Like Growth Factor (IGF)”, “Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)”, “Transforming Growth Factor (TGF)”, “Platelet Derived Growth Factor (PDGF-AB)” and whether these levels were correlated with PRP concentrations or not.

At the end of the study compared to the control group, we have determined statistically significant increase in mitotic activity, in other words proliferation at each and every group except j-ppp and e-ppp. Due to fact that both j-ppp and e-ppp were poor in terms of platelet concentration, increase in proliferation was not meaningful when compared to the control group. When growth factors were examined, PDGF-AB was the factor correlated with the increase of mitotic activity. Increase in other factors were not correlated with proliferation.

PRP; is an autologous blood product which is easily obtainable, with a low side effect profile. At the field of plastic surgery it is used especially for its positive effects at wound healing. It contains the key elements of wound healing such as platelets and growth factors at a high concentration. In our study we have concluded that PRP causes a statistically significant increase in proliferation at fibroblast cell cultures. We have seen

corelation between increased levels of PGDF-AB with proliferation. By preparing equally concentrated PRPs from two different donors we have seen similar effects on proliferation. This made us think that while evaluating the efficieny; concentration is more definitive than platelet count. On the other hand, in order to make our study a reference point for those who are preparing their own PRPs, and in order to understand efficieny of PRP further detailing and research must be done.

Keywords: Platelet Rich Plasma, Fibroblast Cell Culture, PRP standartization, PRP increasing doses

İçindekiler

ÖNSÖZ	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
RESİMLER DİZİNİ	XIII
TABLolar DİZİNİ	XIV
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Trombositlerin yapısı ve içerikleri	2
2.1.1.Alfa granüller:	3
2.1.2.Delta granüller:	3
2.1.3.Lambda granüller:	3
2.2.Büyüme Faktörleri	4
2.2.1.Platelet-Derived Growth Factor:	5
2.2.2.Transforming Growth Faktör-β:	5
2.2.3.Insulin-like Growth Factor:	5
2.2.4.Vascular Endothelial Growth Factor:	5
2.2.5.Fibroblast Growth Factor:	6
2.3. Trombositten Zengin Plazma (TZP)	6
2.3.1.Kullanım Alanları	7

2.4.Fibroblast	8
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1.Hücre Kültürü	10
3.1.1.Tripsinizasyon.....	10
3.1.2.Hücrelerin Pasajlanması.....	11
3.1.3. MTT Testi:.....	11
3.2.Grupların Hazırlanması.....	12
3.3.İşlemler:.....	15
3.3.1. TZP'nin Hazırlanması:	15
4.DEĞERLENDİRME	20
4.1.Genel Değerlendirme:.....	20
4.2. MTT Testi Değerlendirme:	20
4.3. Büyüme Faktörlerinin Değerlendirilmesi:	20
4.4.İstatistiksel Değerlendirme:	21
5. BULGULAR	21
5.1.MTT testi:	21
5.2.Growth Faktör Ölçümleri:	24
5.2.1.Fibroblast Growth Faktör:.....	24
5.2.2. Transforme Growth Faktör:	26
5.2.3. Platelet Derived Growth Faktör:	28
5.2.4. Vasküler Endotelial Growth Faktör:	31

5.2.5. Insulin Like Growth Faktör:	32
6.TARTIŞMA.....	35
7. SONUÇ.....	46
8.KAYNAKLAR	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Trombosit yapısı

Şekil 2: “Buffy Coat”’un şematik görünümü

Şekil-3:TZP hazırlanmasını gösteren şema

Şekil-4:Gruplarda TZP’nin dilüsyonunu gösteren şema

RESİMLER DİZİNİ

RESİM 1:ACD-A tüplere alınmış tam kan

RESİM 2: “Abbott Cell-Dyn 3700 Hematology Analyzer” cihazı

RESİM 3:Santrifüj cihazı

RESİM 4: İlk aşama santrifüj sonrası görünüm

RESİM 5:TZP hazırlanmasına yardımcı düzenek

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Trombosit granüllerinin içerikleri

Tablo-2: Gruplarda MTT sonuçları

Tablo-3: MTT test sonuçlarını gösteren grafik

Tablo-4: MTT için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

Tablo-5: FGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik

Tablo-6: FGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

Tablo-7: Gruplarda FGF sonuçları

Tablo-8: TGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik

Tablo-9: TGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

Tablo-10: Gruplarda TGF sonuçları gösteren tablo

Tablo-11: PDGF-AB ölçüm sonuçlarını gösteren grafik

Tablo-12: PDGF-AB için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

Tablo-13: Gruplarda PDGF-AB sonuçlarını gösteren tablo

Tablo-14: VEGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik

Tablo-15: VEGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

Tablo-16: Gruplarda VEGF sonuçlarını gösteren tablo

Tablo-17: IGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik

Tablo-18: IGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

Tablo-19: Gruplarda IGF sonuçlarını gösteren tablo

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Üzerinde yeterli çalışma bulunmayan, Trombositten Zengin Plazma'nın (TZP), farklı bireylerden hazırlanıp aynı konsantrasyonlarda uygulandığında fibroblast hücre kültürlerinde oluşturduğu etkilerin incelenmesi bu çalışmada amaçlanmıştır.

Trombositlerin hemostaz sürecindeki etkin fonksiyonlarının keşfedilmesi çok eskilere dayanmasına rağmen, yara iyileşmesi üzerindeki etkileri yakın zamanlarda tespit edilmiştir. Trombositten zengin plazma (TZP) ilk olarak 1997 yılında Whitman ve arkadaşları tarafından maksillofasiyal cerrahide kullanılmıştır ve yazarlar, jel içindeki plateletlerin aktivasyonu ve büyüme faktörlerinin salınımı sayesinde, yara iyileşmesinin hızlanması gerektiğini rapor etmişlerdir (1).

Dolaşımdaki trombositler, aktive olmaları durumunda alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıdaki büyüme faktörünü ortama salmaktadırlar, benzer şekilde invitro ortamda da aktive edilebilmektedirler. Yüksek yoğunlukta trombositin konsantre edildiği son ürün "Trombositten Zengin Plazma = TZP" olarak adlandırılır.

Pıhtı içerisindeki aktive trombositler, alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıda büyüme faktörünü ortama salgıladıklarında, bu faktörler uygulama sahası içerisinde büyüme faktörlerinden zengin bir mikro çevrenin oluşmasını sağlamaktadır.

Otolog üretilebiliyor olmaları nedeni ile yeterli hayvan deneyi yapılmadan klinik kullanıma giren TZP, teorik olarak çok şey vaat etmesine rağmen; yeterli kontrollü çalışma olmaması nedeni ile hala sonuçları tartışılmaktadır. Özellikle yüz bölgesinde olmak üzere cilt gençleştirme amaçlı yapılan TZP uygulamalarında uygun miktar ve konsantrasyonun bilinmediği, uygulamaların efektif olmadığı düşünülebilir. Yüz gençleştirmede amaç ciltteki kollajen üretimini arttırmak, mevcut kollajende yeniden yapılanmayı sağlamaktır. TZP uygulandığında içerdiği büyüme faktörleri sayesinde bu sağlanabilmektedir.

Bu çalışmada; TZP'nin farklı bireylerden hazırlanıp aynı konsantrasyonlarda uygulanması ile doku cevabı ve etkin doz belirlenmesi açısından önemli bilgiler elde

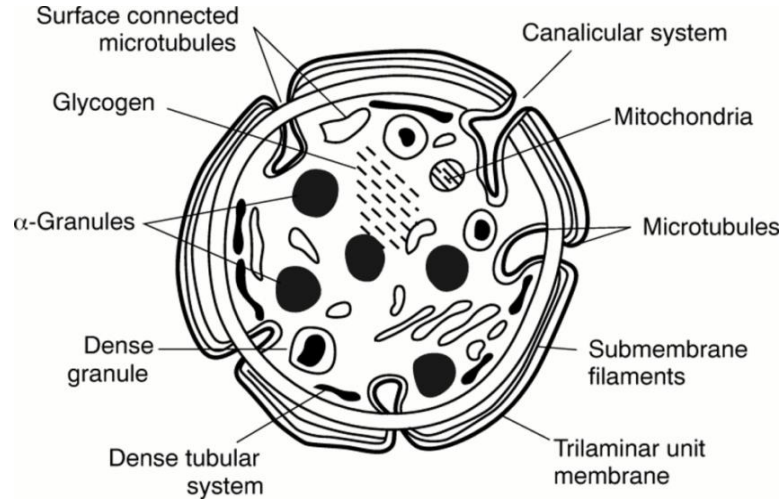
edeceğimizi düşündük. Yine farklı trombosit sayısına sahip donörlerde aynı konsantrasyonda TZP vermenin etkinlikte ne gibi farklılıklara yol açtığını görmeyi hedefledik. Bu sayede mevcut TZP uygulamalarının doğru şekilde ve terapötik dozlarda yapılıp yapılmadığı, uygulamalarda kişiden kişiye farklı hacimler' in gerekip gerekmediği konusunda bir görüş ortaya çıkaracağımızı öngörüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Trombositlerin yapısı ve içerikleri

Trombositler 2–4 μ çapında, disk biçiminde, çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Kemik iliğindeki dev hücreler olan megakaryositler tarafından üretilirler ve periferik kan dolaşımına girdikten sonra yaklaşık 10 gün yaşarlar. Periferik yaymada kümeler halinde gözlenen trombositler tek tek incelendiğinde soluk mavi boyanan ve hyalomer adı verilen şeffaf bir periferik bölge ile mor boyanan ve granüllerin yerleştiği granülomer adı verilen merkezi kısımlardan oluşur. Trombositler, plazma membranının sitoplazma içerisine parmak şeklinde uzantılarından oluşan ve açık kanalikül sistem adı verilen bir kanal sistemine sahiptirler. Bu sistem sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmasını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Hyalomer bölgesi içerisinde yoğun tübül sistem adı verilen ikinci bir kanalikül sistemi daha bulunmaktadır. Bu kanalikül sistemi, primer olarak trombosit aktivasyonu için gerekli olan kalsiyum iyonlarını depolar (2,3,4,5).

Trombositlerde elektron mikroskopik incelemeler ile birbirlerinden ayırt edilebilen başlıca üç tip granül bulunmaktadır. Alfa, delta ve lambda granüller olarak adlandırılan bu granüllerden ışık mikroskobu ile görülebilen granüllerin büyük çoğunluğu alfa granüllerdir. Değişik boyut ve içeriklere sahip olan bu granüllerin işlevleri de birbirlerinden farklıdır (3,5,6)(Şekil-1).



Şekil-1: Trombosit yapısı

2.1.1.Alfa granüller: 200–400 nm çapında olan bu granüller diğerlerine oranla çok daha heterojen bir içeriğe sahiptirler. Boyut ve sayıları nedeni ile trombositlerin major granülleri olarak kabul edilirler. Küresel veya oval şekilli olan bu granüllerin içinde koyu renkli görünen alanlarda proteoglikanlar yer alırken, daha açık renkli periferel zonda Von Willebrand faktör gibi plazma proteinleri ve tübüler yapılar yer almaktadır. Alfa granüllerin hemostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörü içermesi, trombositlerin yoğunlaştırılarak klinikte yara ve kemik iyileşmesi gibi alanlarda kullanımının gündeme gelmesine neden olmuştur (3,6,7).

2.1.2.Delta granüller: Ortalama 150 nm çapa sahip olan bu granüller elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeni ile dens görülmektedirler. Bu nedenle delta granüller yoğun cisimler olarak da adlandırılırlar. Kalsiyum iyonları, pirofosfat, ADP ve ATP gibi protein olmayan molekülleri içeren granüllerdir (5,6).

2.1.3.Lambda granüller: Sadece lizozomal enzimler içeren bu granüllerin çapları 175–250 nm arasında değişmektedir. Bu enzimler, bakterisidal etkileri yanında plazminin tamir fazından sonra bölgedeki pıhtıyı eriterek ortadan kaldırılması sürecinde de görev alan enzimlerdir (5,6).

Tablo 1. Trombosit granüllerinin içerikleri

Delta granül	Alfa granül	Lambda granül
Nükleotidler	Yapışkan glikoproteinler	
	Fibronectin, Vitronectin	
	Von Willebrand Faktör	Asid proteazlar
• ATP, ADP	Trombospondin	• Katepsin D, E
• GTP, GDP	Hemostaz faktörleri	• Karboksipeptidazlar
Aminler	Fibrinojen, Faktör V , VII, XI, XIII, Protein S, Fibrinojen	• Kollajenaz
Serotonin	Hücre sel mitojenler	• Asit fosfataz
Histamin	PDGF, TGF- β , EGF,	• Arilsülfataz
Çift değerlikli kationlar	VEGF, IGF Proteoglikanlar	Glikohidrolazlar
Kalsiyum	Proteaz inhibitörleri	Heparinaz
Magnezyum	Albumin ve immünglobulinler	Diğerleri

2.2. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri kan ürünleri ve lokal dokulardan salgılanan, yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve normal vücut gelişimini kontrol eden proteinlerdir. Spesifik hedef hücreleri çoğalmaya veya göç etmeye aktive ederler (8).

Büyüme faktörleri epitelizasyon, angiogenez ve kollajen metabolizmasını etkileyen hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonunu kontrol ederek yara iyileşmesine katkıda

bulunurlar. Dolaşımda bulunan trombositlerin α -granülleri içinde “Platelet- derived growth factor (PDGF)”, “Transforming growth factor- β (TGF- β)”, “Insulin-like growth factor (IGF)”, “Vascular endothelial growth factor (VEGF)” ve “Epidermal growth factor (EGF)” bulunur. Vücutta ayrıca “Keratinosit growth factor (KGF)” ve “Fibroblast growth factor (FGF)” gibi büyüme faktörleri de bulunmaktadır (3,9).

2.2.1. Platelet-Derived Growth Factor: Trombositlerdeki alfa granüllerden, endotelial hücrelerden, fibroblastlardan, düz kas hücrelerinden ve makrofajlardan sentezlenir. Fibronektin ve hyaluronik asit gibi yaranın yeniden şekil almasında kritik önem taşıyan ekstrasellüler matriks üyelerinin üretimini artırarak ve fibroblastları mitojenik olarak etkileyerek yara iyileşmesini hızlandırır (9,10,11).

2.2.2. Transforming Growth Faktör- β : Vücuttaki tüm hücreler tarafından sentezlenebilen ve yine tüm hücrelerce duyarlı olunan bir faktördür. TGF- β , yara iyileşmesi aşamalarında, trombositlerden başka lenfositler, makrofajlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, epitelyal hücreler ve fibroblastlardan da salgılanmaktadır. Yara yerinde kemotaktik ve anjiogenezi hızlandırıcı etkisi vardır. Ayrıca kollajen, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi birçok matriks proteininin sentezini regüle eder (10,12).

2.2.3. Insulin-like Growth Factor: Keratinosit, osteoblast, fibroblast ve trombosit gibi değişik hücreler tarafından üretilir. Hücre kültürleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar IGF’in fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, epitelyal hücreler gibi pek çok hücre üzerinde mitojenik olduğunu göstermektedir (10).

2.2.4. Vascular Endothelial Growth Factor: İlk olarak tümör hücreleri tarafından sentez edildiğinin bulunmasına rağmen nötrofiller, trombositler, keratinositler gibi birçok hücre tipi tarafından da salgılandığı gösterilmiştir. VEGF, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast ve endotelial hücrelerin proliferasyonunda ve bu hücrelerin göçünün uyarılmasında görevlidir. Ayrıca vasküler geçirgenliği artırarak da yara iyileşmesine katkıda bulunur (10).

2.2.5.Fibroblast Growth Factor: Fibroblast, kondrosit, endotel hücresi, osteoblast ve keratinositler üzerinde mitozu arttırıcı etki gösterir ve anjiogenez ile endotelyal hücre göçünde rol oynar. FGF, anjiogenezin başlaması için gerekli olan kollajenaz üretimini ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar. FGF ailesi içinde asidik FGF ve bazik FGF (bFGF) bulunur (9,10).

2.3. Trombositten Zengin Plazma (TZP)

TZP, otolog trombosit jel, trombosit-zengin büyüme faktörleri, otolog trombosit konsantrasyonu isimleri ile de kullanılır. Periferik kanda normal trombosit konsantrasyonu 140.000–400.000 trombosit/mm³ arasındadır. Plazma kanın sıvı olan kısmıdır ve pıhtılaşma faktörleri, diğer proteinler ve iyonları içerir. TZP basit olarak, yüksek konsantrasyonda trombosit içeriği şeklinde tanımlanabilir. Böyle bir tanım oldukça kabadır ve bu konuyla ilgili çok fazla yazılı materyal olmasına rağmen 1.000.000 trombosit/mm³ ya da periferik kan trombosit içeriğinin yaklaşık 2.5-3 katı olarak tariflenebilir (22).

TZP hazırlanmasındaki temel amaç, büyüme faktörleri içeren trombositlerin konsantrasyonunun arttırılmasıdır. TZP içinde biyolojik olarak oranları belirlenmiş, doğal büyüme faktörleri bulunur. Bu, TZP’i rekombinant büyüme faktörlerinden ayıran özelliktir. Rekombinant büyüme faktörleri saf insan büyüme faktörleridir, ancak doğal büyüme faktörü değildirler. Çoğunlukla çekirdeğine bir bakteriyel plazmid vektör yoluyla insan geni eklenmiş hamsterin over hücre kültürlerinde sentezlenirler (2,15).

Hazırlama metodları, santrifüj sayıları ve devirleri çok değişkenlik gösterse de; TZP hastadan alınan periferik kanın 1 veya 2 santrifüj işlemi sonrası plazma, eritrosit, trombosit konsantrasyonu ve beyaz kan hücrelerine ayrılması prensibi üzerine kurulmuştur. Piyasada TZP hazırlamaya yardımcı ‘The Gravitational Platelet Sequestration System, (Biomet Co, Warsaw, IN, USA)’, ‘The Electa Cell- Separatore (Sorin Group, Mirandola, Italy)’, ‘The Autologous Growth Factor Filter, (Interpore Crossw, Irvine CA, USA)’i vb. çok sayıda sistem geliştirilmiştir (24).

Santrifüj işlemleri sonucunda trombosit sayısı kandaki normal değerin 3–8 katına kadar çıkarılabilir. TZP’de trombosit sayısının etkinlik eşiğinin ortalama 1.000.000/μl kadar olduğu düşünülmektedir (1,3,16,17).

TZP elde edildikten sonra 8 saat antikoagüle halde stabil kalabilir. Ortama kalsiyum ilave edilmesi ile TZP pıhtılaşarak jel halini alır (3,17,18).

Trombositler endotel hasarı sonrası ortaya çıkan Von Willebrand faktör, kollojen, fibronektin ve laminin gibi adezyon moleküllerinin açığa çıkması ile ya da trombin, ADP, kollojen, tromboksan A2, epinefrin ve trombosit aktive edici faktör gibi fizyolojik agonistler ile aktive olurlar (22).

Pıhtılaşma trombositleri aktif hale getirerek büyüme faktörlerinin hızla salgılanmasını sağlar. Oluşan pıhtı içerisindeki aktive trombositler, alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıda büyüme faktörünü ortama saldıklarında, bu faktörler uygulama sahası içerisinde büyüme faktörlerinden zengin bir mikroçevrenin oluşmasını sağlar. Trombositler aktive olduktan sonra 10 dakika içinde depoladıkları büyüme faktörlerinin % 70’i, birinci saat sonunda ise % 100’ü ortama salgılanır (2,3,15).

TZP bir fibrin yapıştırıcı değildir. TZP’de trombosit konsantrasyonu fibrin yapıştırıcıya göre daha fazladır. Ayrıca TZP’deki fibrinojen konsantrasyonu fibrin yapıştırıcıya oranla daha azdır. Daha az fibrinojen içerdiği için uygulandığı ortamda çok katı bir fibrin oluşmaz, bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, aksine içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandırdığı düşünülmektedir. TZP’nin içindeki doğal fibrinojen konsantrasyonu TZP’nin cerrahi alana uygulanmasını kolaylaştıran jelatinöz, yapışkan kıvamını verir (1).

2.3.1.Kullanım Alanları

Otolog TZP uygulamasının yumuşak ve sert dokularda yara iyileşmesini artırdığı deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (21). TZP 1970’li yıllarda klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Diabetik ayak ülseri, venöz ülser gibi kronik yaralarda otolog TZP uygulamasının yara iyileşmesi üzerine pozitif etkileri çalışmalarla gösterilmiştir. Hastaların kendi kanından hazırlanması ile doğal bir tedavi avantajı

sağlayan TZP'nin 'kendi kendine rejenerasyonun anahtarı' şeklinde ifade edilmesine neden olmuştur (23).

TZP'nin ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinin tespit edilmesi, öncelikle maksillofasial ve diş cerrahisi alanında kullanıma girmesine neden olmuştur. Bunun dışında oftalmolojide maküla ve retina yaralanmalarında, ortopedik spinal füzyon ameliyatlarında, rekonstrüktif cerrahide kronik ülser ve iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılmıştır (3,16,19,20,21).

Geçtiğimiz yıllarda yumuşak ve kemik doku üzerinde iyileştirici etkisi gözlemlenen TZP ortopedik, periodontik işlemlerde, maksillofasial cerrahide, ürolojik girişimlerde ve plastik cerrahi işlemlerinde sıkça kullanılmıştır. Bununla ilgili çok sayıda çalışma ve bu konuyla ilgili oldukça çok tartışma vardır. Kimi çalışmacı TZP'nin iyileşme üzerindeki etkilerini gözlemlediğini kimi ise herhangi bir iyileşme gözlemlemediğini iddia etmektedir (22).

2.4.Fibroblast

Fibroblastlar bağ dokusunun sayıca fazla olan ana hücreleridir. Fibroblastlar iğ şeklinde, yassı ve uzun hücrelerdir, ekstrasellüler matriks (ECM) molekülleri ile birlikte vücudun organ ve dokularının büyük kısmında bulunurlar. Gövde kısmında düzensiz dallanmalar yapan sitoplazmik uzantıları, ökromatik fakat nispeten yoğun kromatinli ve oval şekilli çekirdeği, protein sentezi yapan hücrelere özgü gelişmiş, granüllü endoplazmik retikulumu ve geniş golgi kompleksi ile bazofilik sitoplazması bu hücrelerin tipik özellikleridir.

Fibroblastların önemli fonksiyonlarından biri, doku ve organlardaki ECM'in sentezi ve hemostatik dengesidir. Fibroblastlar kollojen, proteoglikan, fibronektin, tenaskin, laminin ve fibronektin gibi ECM bileşenlerinin çoğunu sentezleyen ve salgılayan metabolik olarak oldukça aktif hücrelerdir. Bağ dokusunda fibroblastlar tarafından sürekli sentezlenen üç tip lif vardır. Bunlar kollojen proteininden meydana gelen, oldukça dayanıklı ve sağlam, uzun, düz ve beyaz renkli kollojen lifler, elastin adlı

proteinden meydana gelen ince, elastik ve sarı renkli elastik lifler ve asıl yapı oluşturan retiküler liflerdir.

Fibroblast hücrelerinin her biri günde yaklaşık 3,5 milyon prokollojen sentezlerler (McAnulty ve ark. 1991). Fibroblastlar, hücreler arası sıvı hacmi ve basıncında, ekstrasellüler matriksin (ECM) düzenlenmesinde ve yara iyileşmesinde kritik rol oynayan metabolik olarak aktif hücrelerdir. Fibroblastlar aktif oldukları zaman hem kollojen, proteoglikan ve fibronektinler gibi ECM moleküllerinin salınımı ve sentezini sağlayan çok sayıda golgi, endoplazmik retikulum organellerini hem de ECM'in parçalanmasını sağlayan proteazları içerirler. Hücre yüzey integrinleri ile birlikte sitoskelet proteinleri ve ECM, doku hemostazında ve yara iyileşmesinde önemli olan kasılma kuvvetlerinin oluşumunu sağlar ve hücre hareketini kolaylaştırır (McAnulty 2006).

Fibroblastların aktif olmayan yani lif ve ara madde sentezlemeyen inaktif şekillerine ise fibrosit denmektedir. Fibrositler de uzantılı fakat fibroblasta göre çok az sitoplazmalı hücrelerdir. Bu nedenle mikroskopta sadece çekirdekten ibaretmiş gibi görülürler. Her iki hücrenin de şekli fuziform olup birbirlerine dönüşebilirler. Mitotik yetenekleri sınırlı olmakla beraber, doku yaralanmalarında fibroblasta gereksinim arttığından bölünerek çoğalabilirler. Böylece doku kaybının tamiri, ara madde ve lif senteziyle sağlanır. Aynı şekilde normalde fagositoz yeteneği olmamakla beraber, sürekli uyarılar sonucu gerektiğinde fagositoz yapabilmektedirler.

Fibroblastlar ihtiyaç halinde osteositler gibi diğer hücreler haline dönüşebilirler. Son yıllarda gerektiğinde intrastoplazmik kontraktıl elemanlar ve hücre membranında bağlantı kompleksleri kazanarak myofibroblast olarak adlandırılan hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir (Abe ve ark. 2000; McAnulty 2006). Deri'nin dermis tabakasında sıkı bağ dokunun düzensiz yapısı görülmektedir. Deri esneme ve genişleme özelliği olan bir doku olduğundan kollojen ve elastik fibriller bakımından zengindir. Fibriller değişik yönlerde sıralanmış halde bulunup, hasır örgüsü görünümündedirler.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Klinik Araştırmalar Yerel Etik Kurulu onayı alınarak Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD da ve Farmakoloji Laboratuvarı'nda yapıldı.

Hemogram ve trombosit sayımları Özel Çağrı Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1.Hücre Kültürü

Dondurulmuş halde sıvı azot tankında bulunan kriyo tüplerdeki BJ ATCC CRL-2522 hücreleri 37°C'lik su banyosunda hızla çözöldürölmüş olup (hücrelerin bulunduğu kriyo tüpünün kapak hizasının suya batırılmamasına dikkat edilmiştir) hücreler çözöldükten sonra kriyo tüp ve kapağı %70'lik alkol ile silinmiştir. 15 ml'lik santrifuj tüpüne aktarılıp üzerine 5 ml medyum (%10 FCS, %1 antibiyotik, DMEM) yavaşça eklenmiştir. Tüp 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip, tüpün dibindeki hücre pelleti kalacak şekilde süpernatant dökölmüştür. Ardından hücre pelleti üzerine 10ml yeni medyum eklenerek hücreler iyice süspanse edildikten sonra, hücreler 75 cm²'lik flasklara aktarılmıştır. Ardından mikroskop altında incelenmiştir. Hücrelerin bulundukları flasklara penetre olmaları ve yeniden çoğalmaya başlamaları için hücreler CO₂'li inkübatöre konularak bir gün beklemeye alınmıştır. Bir gün sonrasında mikroskop altında hücrelerin canlılığı incelenip, medyumları değıştirilmiştir.

3.1.1.Tripsinizasyon

Hücreler 24 saatlik inkübasyondan sonra inkübatörden alınıp, steril laminar kabinde içerisinde hücre flaskındaki medyum dökölmüştür. Flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 2 ml steril PBS ile yıkandıktan sonra PBS dökölmüş ve hücrelerin üzerine flask içine 2 ml %0,05'lik tripsin-EDTA dökölmüştür. Sonrasında hücrelerin zeminden ayrılması için bir müddet inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin flask yüzeyinden tek tek ayrılıp ayrılmadıkları mikroskop altında kontrol edilmiştir. Hücreler, yüzeyden ayrıldıktan sonra pastör pipeti yardımıyla steril 15 ml'lik

deney tüpüne aktarılmıştır. Tripsinin etkisini sonlandırmak için hücre süspansiyonunun üzerine 4 ml medyum eklenmiş ve süspansiyon 1300 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp, ardından tüpün dibinde kalan hücre pelleti 4 ml medyum içinde süspanse edilmiştir. Hücreler Thoma lamında sayılarak istenen sayıda flaska ekim yapılmıştır.

3.1.2.Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması, hücrelerin çoğalma kapasitesine göre üç-dört günde bir olacak şekilde yapılmıştır ve bir önceki kültürdeki hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp, 1300 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra toplam hücre miktarının en fazla 1/3’ü kadar hücre taze besiyerine alınıp 75 cm²’lik flasklara aktarılması şeklinde yapılmıştır. Çalışmadan bir önceki pasajın semi-konfluens hücreler kullanılarak yapılmasına ve pasajdan sonra hücrelerin zemine tutunabilmeleri için 24 saat beklenmesine dikkat edilmiştir.

Bir gün öncesinden 24 kuyulu plakanın her bir kuyusuna sırasıyla 350000 hücre/ml konsantrasyonlarında ekilmiş hücre serileri üzerine TZP eklenmiştir. 24 saat sonunda TZP’nin etkileri incelemek için medyumlarda elisa yöntemi ile “Transforming Growth Faktör-Beta (TGF-Beta)”, “İnsilin Like Growth Faktör (IGF)”, “Platelet Derived Growth Faktör (PDGF)”, “Fibroblast Growth Faktör (FGF)” ve ”Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)” düzeyleri ölçüldü.

3.1.3. MTT Testi:

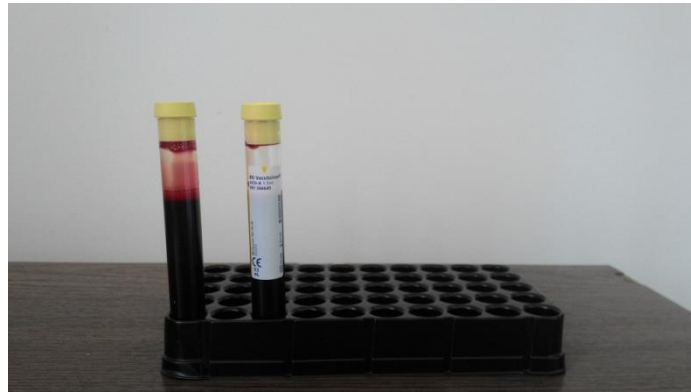
Kolorimetrik metod olarak ilk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan bu testte, sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Oluşan formazan kristalleri izopropanol veya DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir (25).

MTT solüsyonunu eklemeden önce hücrelerin üzerindeki medyum tazelenmiş ve MTT solüsyonu son konsantrasyon 1/10 olacak şekilde bütün örneklerle eklenmiştir. 4 saat

37°C’deki etüvde inkübe edildikten sonra oluşan formazan son ürününün çözünmesi için örneklerin üzerine 1’e 1 hacim olarak DMSO eklenmiş ve çözünmesi için bir süre (yaklaşık 1 gece) 37°C’deki etüvde bekletilmiştir. Örneklerdeki çözünmüş formazan miktarı ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.2.Grupların Hazırlanması

Çalışmada TZP hazırlanması için gereken kan 2 farklı donörden sağlandı. Donörlerden 1.'cisi 26 yaşında erkek, 2.'cisi 29 yaşında erkek idi. Birinci donörün tam kan sayımında trombosit sayısı 277.000/mikrolitre, ikinci donörün 223.000/mikrolitre olarak ölçüldü. Her iki donörde; sol antekübital bölgeden açılan damar yolundan 20 cc' lik enjektörler aracılığı ile yaklaşık 300 cc venöz kan sterilite kurallarına uygun olarak alındı. Alınan kanlar hiç bekletilmeden 1.5 ml ACD-A (Anticoagulan Citrate Dextrose-A) içeren ve 8 cc kan hacime sahip tüplere alındı (Resim-1).



Resim-1: ACD-A Tüplere Alınmış Tam Kan

Eş zamanlı olarak her iki donörden tam kan sayımı içinde kanlar alındı. Tam kan sayımı ve TZP' lerdeki trombosit sayımları “Abbott Cell-Dyn 3700 Hematology Analyzer” cihazında yapıldı (Resim-2).



Resim-2:Abbott Cell-Dyn 3700 Hematology Analyzer

Her iki donörden alınan kanlar 2 aşamalı santrifüjden geçirilerek TZP' ler hazırlandı. Santrifüj işlemleri Nüve Nf400 (Nf 400, Nüve Sanayi Mal. İmalat, Kapasite 4x100mm, max hız 4100 rpm, gücü 310 watt) cihazında yapıldı (Resim-3).



Resim-3: Santrifüj Cihazı

TZP' ler donörler için oluşturulmuş gruplarda fibroblast hücre kültürlerine uygulandı.

Gruplar 2 donöre göre şu şekilde oluşturuldu:

1. donör için;

Grup I: TZP uygulanmayan fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=kontrol)

Grup II: %47 dilüe edilmiş TZP eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=j1)

Grup III: %22 dilüe edilmiş TZP eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=j2)

Grup IV: Dilüe edilmemiş TZP eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=j3)

Grup V: Trombositten Fakir Plazma eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=jppp)

Grup II, III, IV için ayrı ayrı 3' er adet fibroblast içermeyen, sadece hazırlanan TZP ve hücre kültürünün sıvı ortamı olan medium içeren karışımlar hazırlandı. Buradaki amacımız ölçeceğimiz büyüme faktörlerinin kültürdeki fibroblast hücreleri kaynaklı mı yoksa TZP kaynaklı mı olduğunun kontrolünü sağlamaktır. Bu gruplarda; j1ext (n=3) , j2ext (n=3), j3ext (n=3) olarak isimlendirildi.

2. donör için;

Grup I: TZP uygulanmayan fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=kontrol)

Grup II: %47 dilüe edilmiş TZP eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=e1)

Grup III: %22 dilüe edilmiş TZP eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=e2)

Grup IV: Dilüe edilmemiş TZP eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=e3)

Grup V: Trombositten Fakir Plazma eklenen fibroblast hücre kültürü (n=3)(grup adı=eppp)

Grup II, III, IV için ayrı ayrı 3' er adet fibroblast içermeyen, sadece hazırlanan TZP ve hücre kültürünün sıvı ortamı olan medium içeren karışımlar hazırlandı. Buradaki amacımız ölçeceğimiz büyüme faktörlerinin kültürdeki fibroblast hücreleri kaynaklı mı yoksa TZP kaynaklı mı olduğunun kontrolünü sağlamaktır. Bu gruplarda; “e1ext” (n=3) , “e2ext” (n=3), “e3ext” (n=3) olarak isimlendirildi.

Gruplarda dilüsyon oranlarını ayarlarken bu konu ile ilgili yapılmış çalışmaları göz önüne alıp, TZP’de ki trombosit sayısı için eşik değeri 1.000.000/mikrolitre olarak belirledik (29). Dilüsyonu 1. donörde 1.000.000/mikrolitre ve katları olacak şekilde

yaptık. İkinci donörde; daha az trombosit sayısı olan ancak konsantrasyon oranı aynı olan TZP'nin etkinliğini incelemek amacı ile birinci donörle aynı dilüsyon oranlarını kullandık.

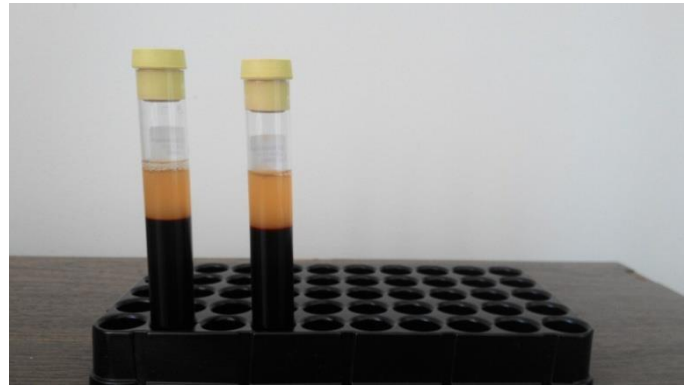
Tüm gruplar için çalışma süresi 24 saat olarak planlandı. Fibroblast hücre kültürleri 24 saat süre ile TZP' ye maruz bırakıldı.

Hücre kültürlerinde medyum hacimleri tüm gruplarda 1 ml olarak belirlendi. Tüm gruplarda eklenen TZP' ler ile birlikte hücre kültür ortamları 2 ml olarak hazırlandı.

3.3.İşlemler:

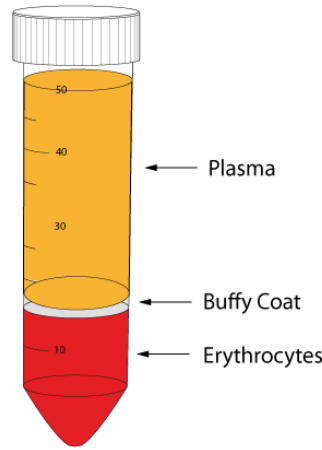
3.3.1. TZP'nin Hazırlanması:

Kan donörü olarak 2 sağlıklı, erkek, tam kan sayımında trombosit sayıları 277.000/mikrolitre ve 223.000/mikrolitre olarak ölçülen gönüllüler seçildi. Bu şekilde iki donörden masif kan alımı uygulamada zorlukları olmasına karşın, TZP' nin daha homojen ve tek tip hazırlanması adına çok faydalı oldu. Trombositten zengin plazma hazırlanması için 2 farklı donörden, sol kol antekübital bölgeden açılan damar yolundan yaklaşık 300 cc venöz kan alındı. Alınan kanlar steril şartlarda ACD-A içeren tüplere aktarıldı. TZP hazırlamada çift aşama santrifüj planlandı. İlk aşamada önce 1.donörün tüm kan tüplerine 180 g (rcf)' de 10 dk santrifüj uygulandı (Resim-4).



Resim-4: İlk aşama santrifüj sonrası görünüm

İlk santrifüj sonrası kan tüplerinden "buffy coat (santrifüj sonrası eritrositler ile plazma arasında kalan kısım = lökositten zengin kısım = leukocytic cream)" sınırının hemen üzerinden 1cc' lik plazma kısmı insülin enjektörü yardımı ile alındı(Şekil-2).



Şekil-2: Buffy Coat'ın Şematik Görünümü

Donörlerin toplam tüp sayısı 3 gruba bölündü;

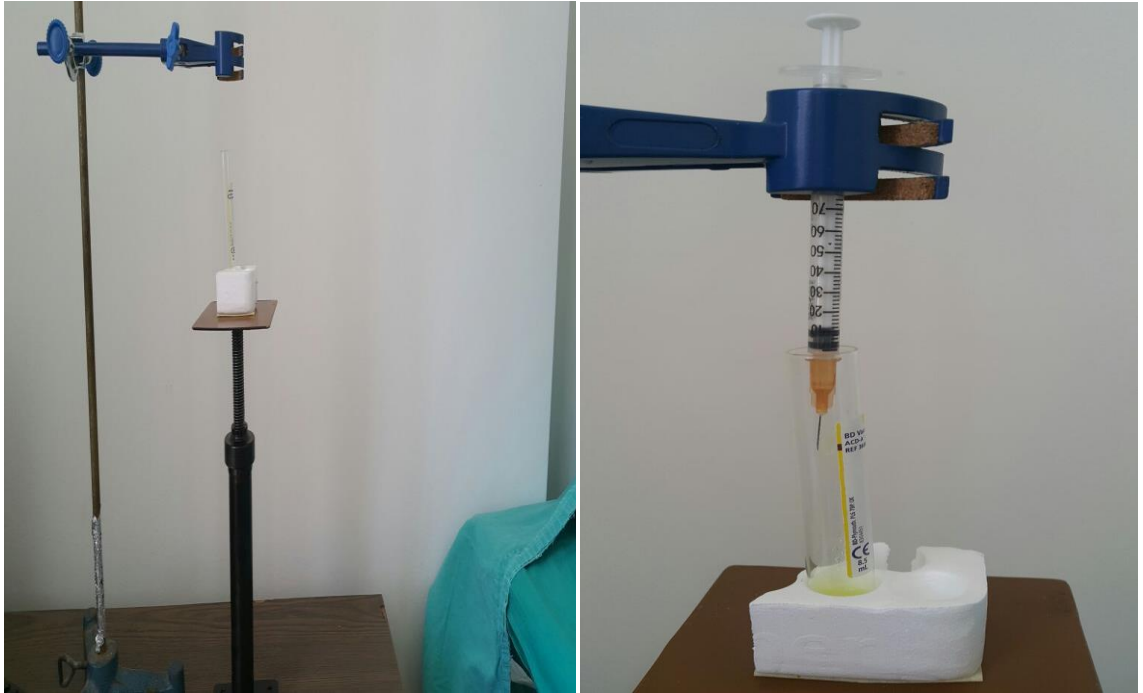
1.grupta, 2 kan tüpünden buffy coat sınırının hemen üzerinden alınan 1'er cc olmak üzere toplam 2 cc lik plazma kısımları tek boş tüpte birleştirildi. *1.grupta* bu şekilde içinde ilk santrifüj işleminden geçirilmiş ve içinde 2 cc plazma bulunan 4 tüp oluşturuldu.

2.grupta, 3 kan tüpünden buffy coat sınırının hemen üzerinden alınan 1'er cc olmak üzere toplam 3 cc lik plazma kısımları tek boş tüpte birleştirildi. *2.grupta* bu şekilde içinde ilk santrifüj işleminden geçirilmiş ve içinde 3 cc plazma bulunan 4 tüp oluşturuldu.

3.grupta, 4 kan tüpünden buffy coat sınırının hemen üzerinden alınan 1'er cc olmak üzere toplam 4 cc lik plazma kısımları tek boş tüpte birleştirildi. *3.grupta* bu şekilde içinde ilk santrifüj işleminden geçirilmiş ve içinde 4 cc plazma bulunan 4 tüp

oluşturuldu. 2. aşamada 3 grupta ilk aşama santrifüj sonrası hazırlanmış toplam 12 adet tüp, 190g (rcf = rölatif santrifüj kuvveti)' de 10 dk süre ile santrifüj edildi.

Tüplerde “buffy coat” sınırının üzerinden plazma kısmını alma işleminde el titremesi, gereğinden fazla derine inme ya da yetersiz derinlikte kalma gibi sorunlarla mücadele etmek ve kolaylık sağlamak amacı ile bir düzenek tasarladık (Resim-5).



Resim-5: Tüplerde plazma alımı için kullanılan mekanik düzenek

Bu düzenekte tüp tabanında aşağı yukarı hareket edebilen bir platformda sabittir. Yukarıda enjektör aşağı ve yukarı hareket edebilen bir kola bağlıdır. Bu kolun ucundaki kısıkaç sayesinde enjektör sabittir. Bu düzenek sayesinde tüpte istenilen derinlikten titreme olmadan plazma kısımları alınabilmiiştir.

Her grupta ve herbir tüpte tabanda 1 cc plazma bırakılacak şekilde üstte kalan plazma kısımları yine insülin enjektörleri yardımı ile alındı. Üstte kalan ve alınan plazma kısımları “Trombositten Fakir Plazma (TFP) ” olarak ayrı steril bir tüpte toplandı. Her bir tüpte tabanda kalan 1 cc lik plazma kısımları “Trombositten Zengin Plazma” olarak ayrıştırılmış oldu. Tüm işlemleri şematize eden şekil aşağıdadır (şekil-3).



Şekil-3:TYP hazırlanmasını gösteren şema

Her grupta sayım için gerekli olacak yaklaşık 0,2 cc lik TZP hacmini; grupların TZP'lerinin hazırlanma aşamasında ayırdık ve sayım yaptırmak üzere laboratuvara götürdük.

Hazırlanan TZP gruplarının donörlere göre ayrıldığında sayım sonuçları şu şekilde oldu.

1. donör;

Grup 1 TZP Trombosit sayısı: 1.877.000/mikrolitre idi. Bu grupta trombosit sayısını 1.000.000/mikrolitre yapmak için %47 dilüe etmek gerekti. Dilüsyon işlemini aynı donörden hazırladığımız TFP (=PPP) ile yaptık ve hücre kültürü gruplarından Grup II (J1)(n=3) hücre kültürlerine uyguladık.

Grup 2 TZP Trombosit sayısı: 1,936.000/mikrolitre idi. Bu grupta trombosit sayısını 1.500.000/mikrolitre yapmak için TZP'yi %22 dilüe etmek gerekti. Dilüsyon işlemini aynı donörden hazırladığımız TFP (=PPP) ile yaptık ve hücre kültürü gruplarından Grup III (J2)(n=3) hücre kültürlerine uyguladık.

Grup 3 TZP Trombosit sayısı: 2.026.000/mikrolitre idi. Bu grupta trombosit sayısını 2.000.000/mikrolitre yapmayı planladık. Bu yüzden dilüsyon yapmadık. Hücre kültürü gruplarından Grup IV (J3)(n=3) hücre kültürlerine uyguladık.

2. donör;

Grup 1 TZP Trombosit sayısı: 1.216.000/mikrolitre idi. Bu grupta 1. donör ile aynı dilüsyon oranları kullanıldı. TZP %47 dilüe edildi. Dilüsyon işlemini aynı donörden hazırladığımız TFP (=PPP) ile yapıldı. Hücre kültürü gruplarından Grup II (e1)(n=3) hücre kültürlerine uygulandı.

Grup 2 TZP Trombosit sayısı: 1.264.000/mikrolitre idi. Bu grupta 1. donör ile aynı dilüsyon oranları kullanıldı. TZP %22 dilüe edildi. Dilüsyon işlemini aynı donörden hazırladığımız TFP (=PPP) ile yapıldı. Hücre kültürü gruplarından Grup III (e2)(n=3) hücre kültürlerine uygulandı.

Grup 3 TZP Trombosit sayısı: 1.560.000/mikrolitre idi. Bu grubun 1. donör ile aynı olması planlandı ve dilüsyon yapılmadı. Hücre kültürü gruplarından Grup IV (e3)(n=3) hücre kültürlerine uygulandı.

4.DEĞERLENDİRME

4.1.Genel Değerlendirme:

Çalışmaya dahil edilen tüm gruplarda çalışma süresi 24 saat olarak planlandı. Çalışma hücre kültürleri üzerinde olduğundan tüm aşamalarda sterilite kurallarına uyuldu. 24 saat sonunda tüm gruplarda hücreler atılıp medyumları uygun koşullarda alınıp -80 derecede saklandı. Sonrasında MTT testi ve büyüme faktör seviyelerinin ölçümleri yapıldı.

4.2. MTT Testi Değerlendirme:

MTT solüsyonunu eklemeyen önce hücrelerin üzerindeki medyum tazelenmiş ve MTT solüsyonu son konsantrasyon 1/10 olacak şekilde bütün örneklerle eklenmiştir. 4 saat 37°C'deki etüvde inkübe edildikten sonra oluşan formazan son ürününün çözünmesi için örneklerin üzerine 1'e 1 hacim olarak DMSO eklenmiş ve çözünmesi için bir süre (yaklaşık 1 gece) 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Örneklerdeki çözünmüş formazan miktarı ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

4.3. Büyüme Faktörlerinin Değerlendirilmesi:

Uygun tampon ile homojenize edilmiş olan hücre kültürü medyumlarının santrifüjü sonrasında süpernatant kısmından büyüme faktörlerinin ekspresyonunun değerlendirilmesi amacı ile enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) uygulandı. Tüm gruplarda hücre kültürü medyumlarında Transforme Growth Faktör, Platelet Derived Growth Faktör, Insulin Like Growth Faktör, Fibroblast Growth Faktör ve Vasküler Endotelial Growth Faktör ölçümleri yapıldı.

4.4.İstatistiksel Değerlendirme:

Elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 22.0 paket programına girilerek analiz edildi. Gruplar arasında verilerin değerlendirilmesinde anlamlı fark olup olmadığını bulmak için varyans analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Anlamlı farkı oluşturan grubun bulunabilmesi amacıyla gruplar arası karşılaştırmada post hoc Tukey HSD testi yapıldı. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

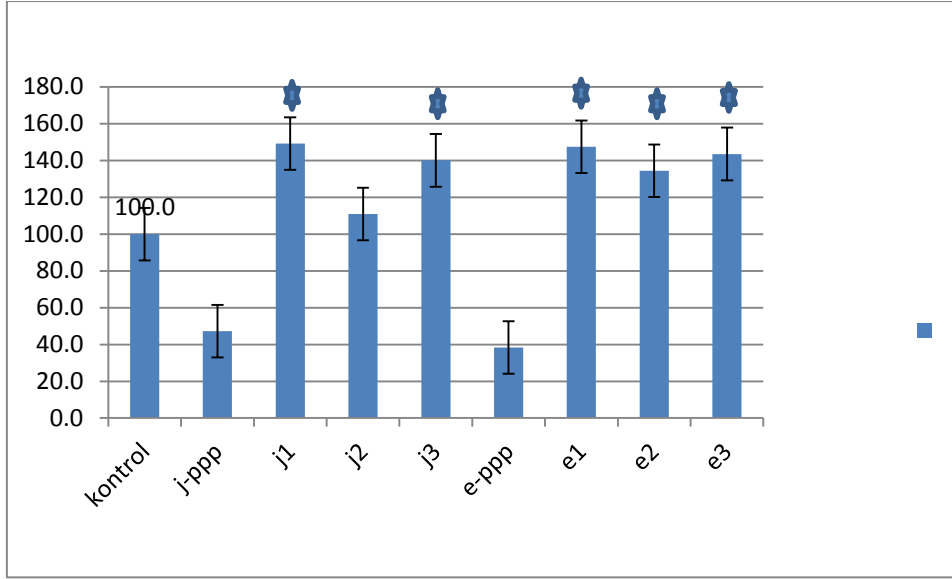
5.1.MTT testi:

Tüm gruplarda MTT testi uygulandı. Kontrol hücre kültürü gruplarına göre TZP uygulanan tüm gruplarda istatistiksel olarak mitotik aktivite artışı açısından anlamlı farklar bulundu. Tüm grupların sonuçları aşağıda gösterilmiştir (Tablo-2).

	Ort. %	Std.Sapma	Std. Hata
Kontrol	100,0	12,32	5,028
J-ppp	47,2	8,3	4,8
J1	149,1	29,5	17,0
J2	111,0	19,2	11,1
J3	140,0	3,5	2,0
E-ppp	38,4	0,4	0,2
E1	147,5	27,0	15,6
E2	134,4	22,3	12,9
E3	143,5	13,8	8,0

Tablo-2: Gruplarda MTT sonuçları

Kontrol grubuna göre en fazla mitotik aktivite artışı gösteren grup; %149 sonucu ile “j1” çalışma grubu oldu. Sırasıyla kontrol grubuna göre mitotik aktivite artışı; en fazla %47 dilüsyon oranına sahip j1 ve e1 gruplarında, daha sonra dilüsyon uygulanmayan j3 ve e3 gruplarında, son olarak ta %22 dilüsyon oranına sahip j2 ve e2 gruplarında gözlemlendi. Kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük mitotik aktivite gösteren “jppp” ve “eppp” gruplarında sonuçlar sırasıyla kontrol grubuna %47,2 ve %38,4 oldu. Her iki donörde jpp ve eppp grupları karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı fark bulunamadı (Tablo-3).



Tablo-3: MTT test sonuçlarını gösteren grafik (“★” İşaretli guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$)).

Gruplar arasındaki istatistiki fark olup olmadığı One Way Anova yöntemi ile belirlendi (Tablo-4).

ANOVA

sonuçlar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44446,773	8	5555,847	18,704	,000
Within Groups	6237,868	21	297,041		
Total	50684,642	29			

Tablo-4: MTT için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

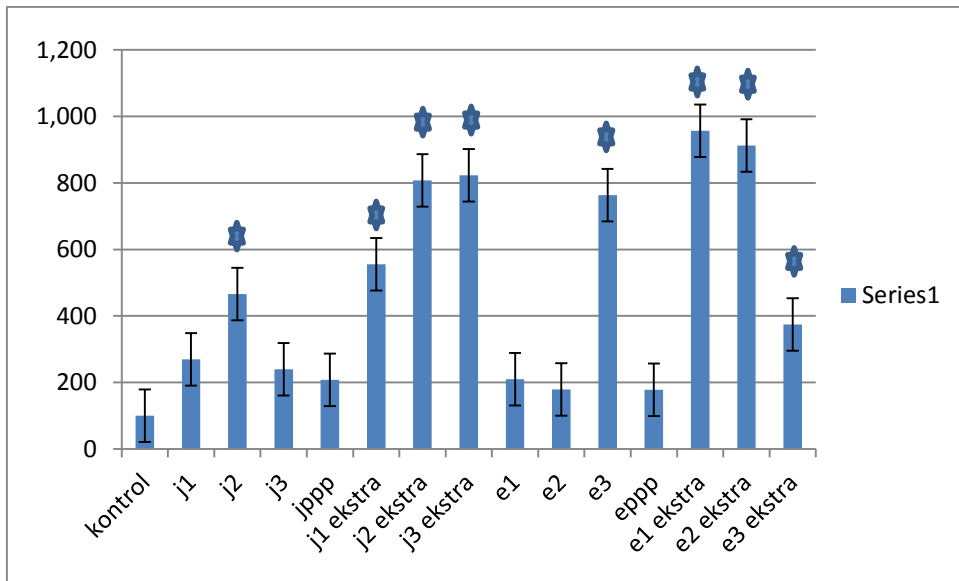
Trombositten Fakir Plazma (TFP) uygulanan hücre kültürü gruplarında hücrelerdemitotik aktivite artışı minimumda gözlemlendi. Hücre ölümleri gözlemlendi. Bu gruplara TFP uygulamadan önce filtreden geçirildi.

5.2.Growth Faktör Ölçümleri:

Çalışmada 5 ayrı büyüme faktörü ölçümü yapıldı.

5.2.1.Fibroblast Growth Faktör:

TZP uygulanan tüm hücre kültürü gruplarında ve her iki donör için TZP+hücre kültür mediumu olan solüsyonlarda enzyime-linked immunosorbent assay (ELISA) ile Fibroblast Growth Faktör (FGF) ölçümleri yapıldı (Tablo-5).



Tablo-5: FGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik (“★” İşaretli gruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$)).

Gruplar arasındaki istatistiki fark olup olmadığı One Way Anova yöntemi ile belirlendi (Tablo-6).

ANOVA

sonuçlar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4005618,546	14	286115,610	15,150	,000
Within Groups	566578,481	30	18885,949		
Total	4572197,027	44			

Tablo-6: FGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

FGF düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren tablo aşağıda yer almaktadır (Tablo-7).

	Ort. %	Std.Sapma	Std.Hata
kontrol	100	12,60118	7,275295
j1	269,1725	226,3586	130,6882
j2	466,0797	247,9353	143,1455
j3	239,5195	98,37797	56,79855
jppp	207,5988	79,83124	46,09059
j1 ekstra	555,1198	18,4903	10,67538
j2 ekstra	807,744	324,5267	187,3656
j3 ekstra	822,9416	123,2964	71,18523
e1	209,8705	44,77728	25,85217
e2	179,2118	34,62662	19,99169
e3	762,8512	225,0331	129,9229
eppp	177,9985	99,19184	57,26844
e1 ekstra	956,477	23,33565	13,47284
e2 ekstra	912,5926	35,92402	20,74074
e3 ekstra	373,8791	82,00768	47,34716

Tablo-7: Gruplarda FGF sonuçları

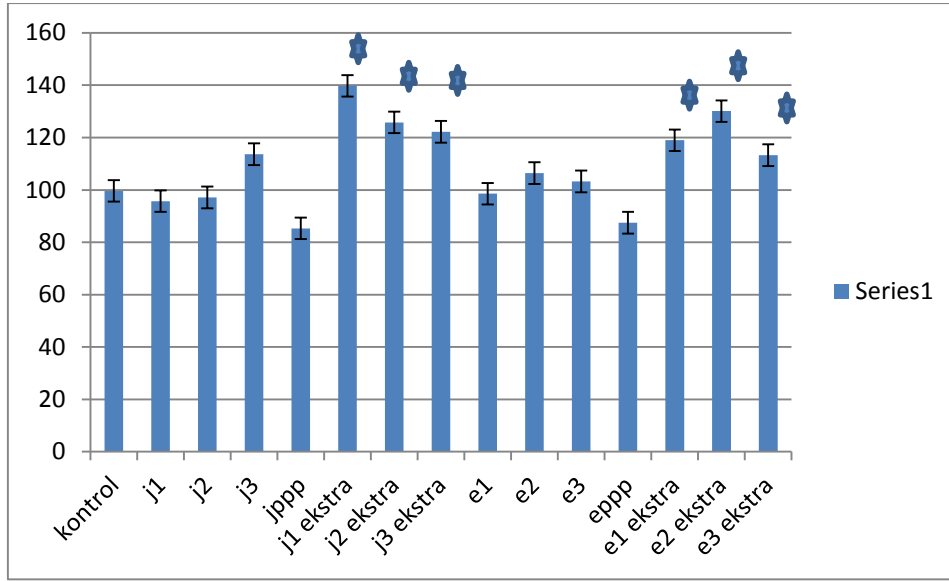
Sonuçlarda; TZP uygulanan hücre kültürü grupları içinde istatistiki açıdan kontrol grubuna göre en anlamlı artış “E3” grubunda %762 ile oldu. Ayrıca hücre içermeyen, TZP+Medium içeren çalışma gruplarındaki FGF sonuçları istatistiki açıdan anlamlı olmak üzere, kontrol grubu ve TZP uygulanan fibroblast hücre kültürü gruplarına göre artışlar dikkat çekti.

TZP+hücre kültürü çalışma gruplarında “J2” ve “E3” sonuçları kontrol grubuna göre istatistiki açıdan anlamlı artmış olarak bulundu. Bu gruplardaki sonuçlar sırasıyla %466 ve %762 oldu. TFP uygulanmış hücre kültürlerinde FGF düzeylerindeki artış, istatistiki açıdan kontrol grubuna göre anlamlı olarak bulunmadı.

TZP+medium içeren çalışma grupları “j1ext, j2ext, j3ext, e1ext, e2ext, e3ext” olarak isimlendirildiler. Bu gruplardaki FGF düzey artışları en çok “E1ext” grubunda %912 ile oldu. TZP+Medium içeren gruplar için kullanılan TZP’ ler; her iki donörde de dilüe edilmeden verilmiş, diğer gruplara göre sayıca ve konsantrasyon olarak daha fazla trombosit içeren TZP’lerdi. Genel olarak yüksek konsantrasyon ve sayıda trombosit içeren TZP bulunan solüsyonlarda FGF düzeyleri daha yüksek ölçüldü.

5.2.2. Transforme Growth Faktör:

TZP uygulanan tüm hücre kültürü gruplarında ve her iki donör için TZP+hücre kültür mediumu olan solüsyonlarda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile Transforme Growth Faktör (TGF) ölçümleri yapıldı (Tablo-8).



Tablo-8: TGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik (“*” İşaretli guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$)).

Gruplar arasındaki istatistiki fark olup olmadığı One Way Anova yöntemi ile belirlendi (Tablo-9).

ANOVA

sonuçlar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10706,811	14	764,772	9,511	,000
Within Groups	2412,254	30	80,408		
Total	13119,065	44			

Tablo-9:TGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

Sonuçlarda; TZP uygulanan hücre kültürü grupları içinde istatistiki açıdan kontrol grubuna göre anlamlı artış “J3” grubunda %114 ile oldu. TZP+medium içeren çalışma

gruplarının tamamındaki TGF artış sonuçları kontrol grubuna göre istatistiki açıdan anlamlı olarak bulundu. Bu gruplardan en belirgin artış “J1ext” grubunda %140 ile oldu. Sonuçları gösteren tablo aşağıda yer almıştır (Tablo-10).

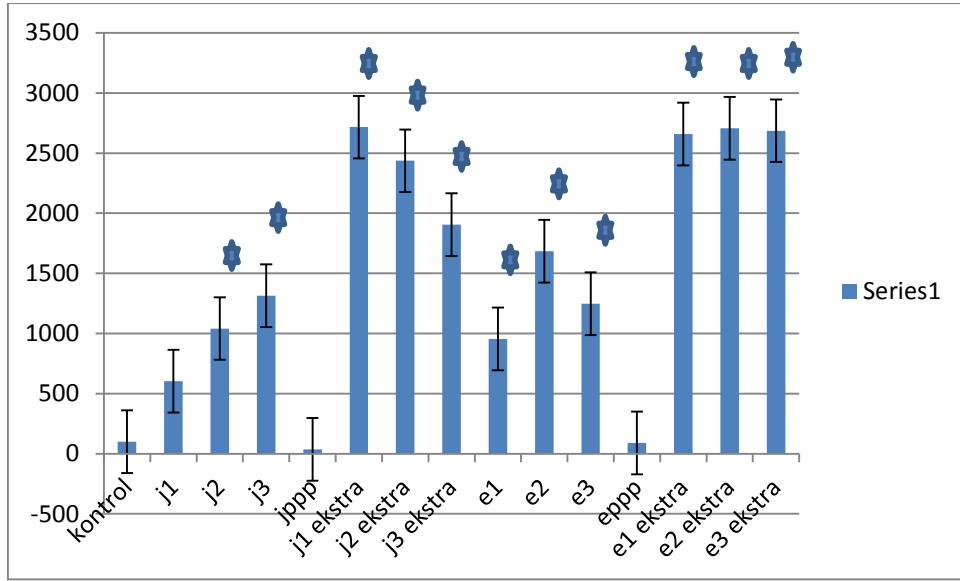
	Ort. %	Std.Sapma	Std.Hata
kontrol	100	3,46	2,00
j1	96	6,54	3,78
j2	97	6,48	3,74
j3	114	8,69	5,02
jppp	85	1,64	0,95
j1 ekstra	140	3,23	1,86
j2 ekstra	126	9,19	5,30
j3 ekstra	122	9,39	5,42
e1	99	6,57	3,79
e2	106	13,98	8,07
e3	103	11,38	6,57
eppp	87	3,46	2,00
e1 ekstra	119	10,82	6,25
e2 ekstra	130	11,33	6,54
e3 ekstra	113	14,91	8,61

Tablo-10: Gruplarda TGF sonuçları gösteren tablo

TFP+hücre kültürü çalışma gruplarında TGF artışları kontrol grubuna göre düşük olarak ölçüldü.

5.2.3. Platelet Derived Growth Faktör:

TZP uygulanan tüm hücre kültürü gruplarında ve her iki donör için TZP+hücre kültür mediumu olan solüsyonlarda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile Platelet Derived Growth Faktör-AB (PDGF-AB) ölçümleri yapıldı (Tablo-11).



Tablo-11: PDGF-AB ölçüm sonuçlarını gösteren grafik (“*” İşaretli guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

Gruplar arasındaki istatistiki fark olup olmadığı One Way Anova yöntemi ile belirlendi (Tablo-12).

ANOVA

sonuçlar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42766639,185	14	3054759,942	142,394	,000
Within Groups	643584,002	30	21452,800		
Total	43410223,187	44			

Tablo-12:PDGF-AB için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

TZP+hücre kültürü içeren ve TZP+ medium içeren hücre içermeyen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiki açıdan anlamlı farkı gösteren sonuçlar çıktı. TZP+hücre kültürü gruplarında kontrol grubuna göre en fazla PDGF-AB düzey artışı “E2” grubunda %1685 ile oldu. TZP + medium içeren, hücre içermeyen gruplarda kontrol grubuna göre en fazla PDGF-AB düzey artışı “J1ext” grubunda %2716 ile oldu. Sonuçları gösteren tablo aşağıda yer almaktadır (Tablo-13).

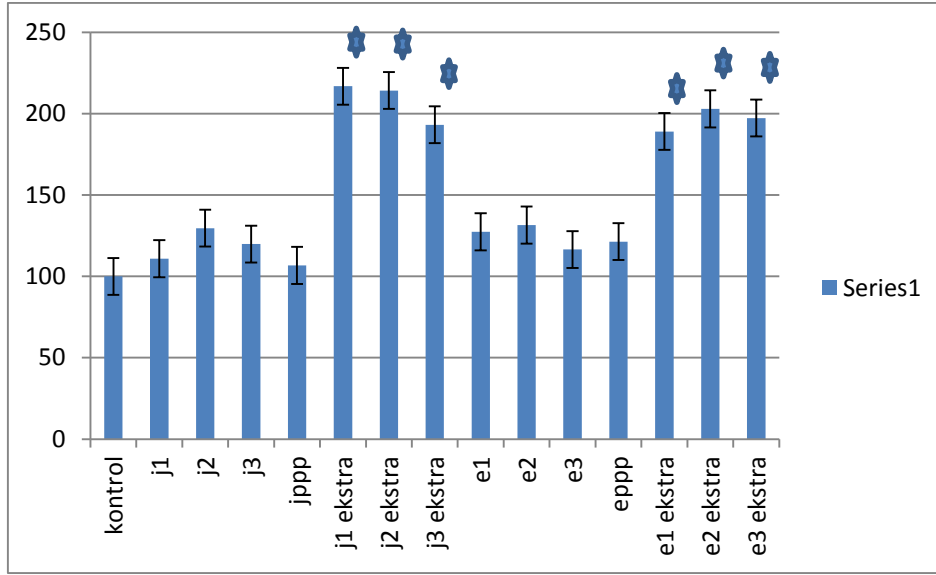
	Ort%	Std.Sapma	Std.Hata
kontrol	100	10,45	6,03
j1	604	24,16	13,95
j2	1041	278,99	161,08
j3	1314	19,04	10,99
jppp	36	0,00	0,00
j1 ekstra	2716	180,46	104,19
j2 ekstra	2437	76,31	44,06
j3 ekstra	1905	44,33	25,59
e1	954	217,24	125,42
e2	1685	81,82	47,24
e3	1248	60,26	34,79
eppp	90	6,45	3,72
e1 ekstra	2660	156,09	90,12
e2 ekstra	2707	249,43	144,01
e3 ekstra	2686	241,68	139,53

Tablo-13: Gruplarda PDGF-AB sonuçlarını gösteren tablo

TFP+hücre kültürü çalışma grupları sonuçları ile kontrol grubu arasında istatistiki açıdan anlamlı olmamakla beraber kontrol grubuna göre düşük PDGF-AB sonuçları elde edildi.

5.2.4. Vasküler Endotelial Growth Faktör:

TZP uygulanan tüm hücre kültürü gruplarında ve her iki donör için TZP+hücre kültür mediumu olan solüsyonlarda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) ölçümleri yapıldı (Tablo-14).



Tablo-14:VEGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik (“★” İşaretli guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Gruplar arasındaki istatistiki fark olup olmadığı One Way Anova yöntemi ile belirlendi (Tablo-15).

ANOVA

sonuçlar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	80989,333	14	5784,952	37,920	,000
Within Groups	4576,667	30	152,556		
Total	85566,000	44			

Tablo-15: VEGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

TZp+ medium içeren, hücre içermeyen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiki açıdan anlamlı farkı gösteren sonuçlar çıktı. Bu gruplardan kontrol grubuna göre en fazla VEGF artışı gözlenen grup %217 ile “J1ext” oldu.

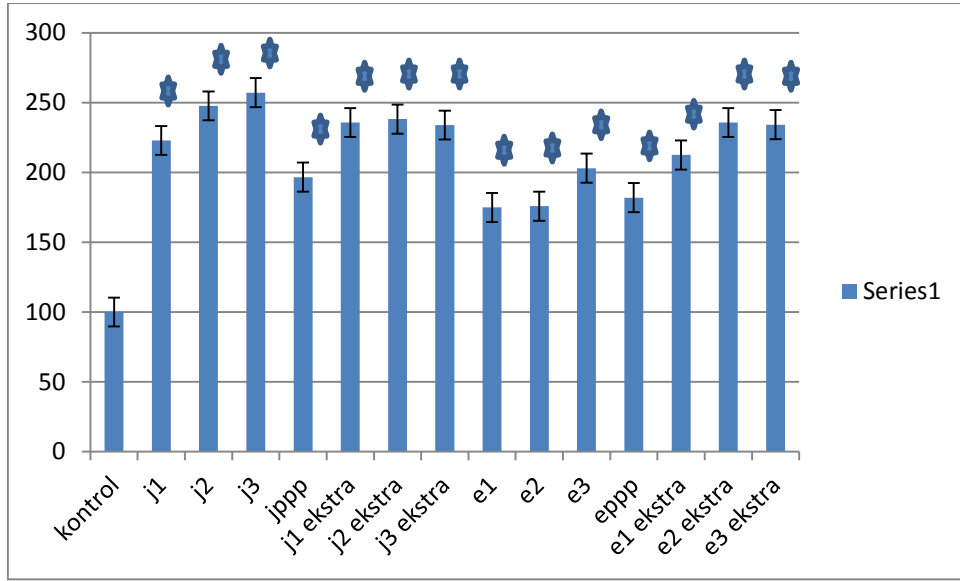
TZP+hücre kültürü çalışma gruplarında istatistiki açıdan kontrol grubuna göre anlamlı VEGF artışı gözlenen gruplar “J2” ve “E2” oldu. Kontrol grubuna göre artış yüzdeleri sırasıyla %130 ve %132 oldu. Sonuçları gösteren tablo aşağıda yer almaktadır (Tablo-16).

	Ort%	Std.Sapma	Std.Hata
kontrol	100	3,6254313	2,0931437
j1	111	1,7227722	0,994643
j2	130	12,199229	7,0432282
j3	120	5,3298652	3,0771991
jppp	107	6,5114668	3,7593971
j1 ekstra	217	18,74805	10,824191
j2 ekstra	214	22,640811	13,071678
j3 ekstra	193	10,233573	5,9083563
e1	127	20,887502	12,059405
e2	132	3,6254313	2,0931437
e3	117	2,8382826	1,6386832
eppp	121	6,413051	3,7025767
e1 ekstra	189	19,414656	11,209057
e2 ekstra	203	11,278191	6,5114668
e3 ekstra	197	10,336633	5,9678579

Tablo-16: Gruplarda VEGF sonuçlarını gösteren tablo

5.2.5. Insulin Like Growth Faktör:

TZP uygulanan tüm hücre kültürü gruplarında ve her iki donör için TZP+hücre kültür mediumu olan solüsyonlarda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile Insulin Like Growth Faktör (IGF) ölçümleri yapıldı (Tablo-17).



Tablo-17: IGF ölçüm sonuçlarını gösteren grafik (“✳” İşaretli guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$)).

Gruplar arasındaki istatistiki fark olup olmadığı One Way Anova yöntemi ile belirlendi (Tablo-18).

ANOVA

sonuçlar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	67859,969	14	4847,141	22,816	,000
Within Groups	6373,272	30	212,442		
Total	74233,241	44			

Tablo-18: IGF için gruplar arası istatistiksel farkı gösteren tablo

TZP+ hücre kültürü içeren ve TZP + medium içeren hücre içermeyen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiki açıdan anlamlı farkı gösteren sonuçlar çıktı. Tüm gruplarda IGF'nin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olarak bulundu. TZP+hücre kültürü çalışma gruplarında kontrol grubuna göre en yüksek sonuç "J3" grubunda %253 ile oldu. Sonuçları gösteren tablo aşağıda yer almaktadır (Tablo-19)

	Ort.%	Std Sapma	Std.Hata
kontrol	100	20,779361	11,99697
j1	222,93578	3,1780749	1,8348624
j2	247,70642	25,341701	14,631038
j3	257,18654	16,825131	9,713994
jppp	196,63609	9,6366674	5,5637325
j1 ekstra	235,77982	15,018996	8,6712213
j2 ekstra	238,2263	2,3088179	1,3329966
j3 ekstra	233,94495	1,5890374	0,9174312
e1	174,92355	5,6055972	3,236393
e2	175,84098	24,962447	14,412075
e3	203,0581	15,605322	9,0097369
eppp	181,95719	11,098011	6,4074394
e1 ekstra	212,53823	16,109562	9,3008601
e2 ekstra	235,77982	11,712977	6,7624906
e3 ekstra	234,25076	8,6712213	5,006332

Tablo-19: Gruplarda IGF sonuçlarını gösteren tablo

6.TARTIşMA

Çalışmamızda TZP'nin artan dozlarında fibroblast hücre kültürü üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile iki farklı donörden hazırlanmış TZP'leri farklı dilüsyon oranlarında hücre kültürlerine uyguladık. TZP, üzerinde çok fazla çalışma yapılmış, hala çok soru işaretinin olduğu, bir standartın oluşturulamadığı, daha çok çalışmanın gerektiği bir konu halini almıştır.

İlk kayıtlı otolog TZP enjeksiyonu; açık kalp operasyonunda, 1987 yılında kullanılmıştır (26). 20 yıla yakın süre öncesinde dental alanda, çene rekonstrüksiyonu yapılmış kanserli hastalarda iyileşmeyi hızlandırmak amaçlı, omurga yaralanması sonrası kemik iyileşmesinde kullanılmıştır. TZP; omurga yaralanması sonrası kemik iyileşmesinde, diş hekimliğinde, plastik cerrahide yumuşak doku iyileşmesine yardımcı olmak amaçlı kullanılmıştır. TZP tedavisi yaygın olarak popülaritesini 2009 yılı başlarında kazanmıştır. Superbowl'u kazanmadan önce Pittsburgh Steelers'tan iki sporcu bilek sakatlıkları için TZP tedavisi aldıktan sonra popülaritesi artmıştır (26). Medyanın dikkati üzerine, kanıtlanmamış bir tedavi olarak spor yaralanma tedavileri arasına girmiştir. Günümüzde TZP tedavisi kardiyovasküler cerrahi, ortopedi, üroloji, maksillofasyal cerrahi, estetik ve plastik cerrahi, oral maksillofasiyal cerrahi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Günümüzde TZP'nin etki mekanizmasını değerlendirmek ve standardize edebilmek amacı ile pek çok çalışma devam etmektedir (26).

Anitua E ve ark. yaptıkları çalışmada TZP'nin normal trombosit sayısının 1.5 ila 3 kata kadar konsantre edildiği durumlarda en efektif etkinliğe sahip olduğunu iddia etmektedirler (27, 28). Bu iddiayı göz önüne aldığımızda trombosit sayısını 3 kattan fazlasına konsantre etmenin avantaj sağlamayacağını düşünebiliriz. Tabi bu iddia trombositlerin etkinlik adına eşik konsantrasyon değerinin 1.000.000/mm³ olduğunu iddia eden görüşe göre farklılık yaratmaktadır (29). Biz de bu nedenle çalışmamızda trombosit konsantrasyonunu arttırırken 1.5, 2 ve 4 kata kadar olacak şekilde planladık. Daha fazlasını çalışmaya almadık. Çünkü belli bir eşik değer üzerinde etkinlik artmamakta hatta bazen ters etki yapmaktadır (33).

Everts ve ark. plazma jel hazırlama tekniklerini karşılaştırmışlar. GPS, Electa-cell Separator ve Otolog AGF gibi üç sistemi karşılaştırmışlar. Bu üç sisteminde bir standart sağlamadığını, üçünün de ölçümlerinin farklı olduğunu göstermişler. Özellikle Otolog AGF sisteminin trombositleri, hazırlama sırasında aktive ettiğini görmüşler. Bu sistemde hazırladıkları jel için “platelet jel” değil de platelet sekresyonları olan “büyüme faktörlerinden oluşan bir solüsyon” olarak düşünülebilir yorumunu yapmışlardır. Ayrıca hem TZP’de hem Platelet Jel’de plateletlerden eksprese edilen IGF-1 düzeylerini istatistiki açıdan farklı bulmamışlar. IGF-1’in plateletten değil plazmadan kaynaklandığını düşünmüşlerdir (30). Bizim çalışmamızda da IGF-1 düzeyleri kontrol grupları hariç plazma içeren tüm gruplarda yüksek bulundu. Kontrol grubuna göre bu yükseklikler anlamlı idi.

Aynı çalışmada yazar, trombosit aktivasyonu için Beta Thromboglobulin ölçüm yöntemini kullanmış. Beta Thromboglobulin plazma seviyelerini ölçerek trombositlerin aktive olup olmadıklarını göstermiş. Otolog AGF sisteminde aktivasyon işlemi olmadan da beta thromboglobulin seviyeleri yüksek bulunmuş. Diğer iki sistemde aktivasyon sonrası beta thromboglobulin seviyeleri yüksek bulunmuş (30).

TZP hazırlarken antikoagülan kullanılmadığında trombositler santrifüjün mekanik stresi ile aktive olmaktadır (31). Bu yüzden TZP hazırlarken antikoagülan kullanımı zorunludur. Na Sitrat, Sitrat Fosfat Dekstroz, ACD-A, EDTA gibi antikoagülanlar kullanılabilir. Bunların kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmış olup genel olarak çalışmalarda ACD-A kullanımı öne çıkmaktadır. Çalışmamızda ACD-A antikoagülanını tercih ettik(43).

TZP hazırlanmasında hazır kitler, TZP sistemleri bulunmakla beraber, bu kitlerin yüksek maliyetlerinin yanısıra belirlenmiş bir standartı bulunmaması nedeni ile bir çok araştırmacı ve kullanıcı kit kullanmadan kendi TZP’sini hazırlamaktadır. Kitler ve sistemler ile elde edilen TZP ler arasında da farklılıklar olduğu kabul edilmektedir. Bu farklılıklar nedeni ile standart bir TZP elde edilememektedir. Bu nedenle bizde çalışmamızda kit veya sistem kullanmadan daha ekonomik olan kendi TZP’mizi hazırladık.

Yüksek santrifüj hızları, TZP hazırlama esnasında trombositlerin erken aktivasyonuna neden olabilmektedir. Yüksek santrifüj hızları trombosit fonksiyonlarını bozmakta, azaltmakta, etkisini zayıflatmaktadır (31, 32). Ayrıca yüksek santrifüj hızları daha fazla konsantrasyon sağlamak amacı ile kullanılsa da, çok fazla konsantrasyona sahip olmanın daha fazla TZP etkinliği sağlamadığı iddia edilmektedir (31).

Biz de çalışmamızda ilk aşama santrifüj için 180 g'de 10 dakika, ikinci aşama santrifüj için 190 g'de 10 dk olarak santrifüj hız ve sürelerimizi belirledik. Bu hız ve süreleri belirlemede, yapılmış çalışmaları baz alarak ortalama değerler olduğunu düşünerek hareket ettik.

Graziani ve ark. çalışmalarında değişik konsantrasyonlarda TZP uygulamalarında çok yüksek ve düşük konsantrasyonların fibroblastlara etkisi açısından farklı sonuçlar çıkarmadığını, genellikle 2.5 kat gibi bir konsantrasyonun fibroblast ve osteoblastlar üzerinde daha iyi sonuç verdiğini görmüşler (33). Biz çalışmamızda gruplarımızın sonuçlarına baktığımızda; "j1" grubunda 1.8 kat konsantrasyon, "j2" grubunda 2.5 kat konsantrasyon, "j3" grubunda 3,6 kat konsantrasyon, "e1" grubunda 1.5 kat konsantrasyon, "e2" grubunda 2.5 kat konsantrasyon, "e3" grubunda 3.3 kat konsantrasyon elde ettik. Grupların tamamında hücre kültürlerindeki fibroblastların proliferasyonunda (mitotik aktivite artışı) istatistiksel olarak kontrol grubuna göre artmış bulunmuştur. Bu grupları kendi aralarında istatistiki açıdan karşılaştırdığımızda anlamlı fark bulunmadı. Bir eşik konsantrasyondan sonra daha fazla konsantre etmenin anlamı olmadığını düşünüyoruz. Anitua E ve ark. yaptıkları çalışmanın bulgularına benzer sonuçlar bulduğumuz yönünde yorumladık (27, 28). Rappl LM ve ark. yaptığı çalışmada 1-3 kat konsantrasyon sağlanmış TZP'nin yara iyileşmesinde yüksek konsantrasyonlara göre daha etkin olduğunu göstermiştir (34).

Graziani ve arkadaşları TZP'nin artan konsantrasyonlarda uygulanmasının fibroblast ve osteoblast hücre kültürlerine etkisini incelemişlerdir. Graziani daha çok osteoblastlara yoğunlaşmış ve fibroblastlarda mitotik aktiviteyi değerlendirmiştir. Çalışmasında fibroblastlarda mitotik aktiviteyi 24 saat ve 72 saatlik sürelerde değerlendirmiş, 24 saat sonunda kontrol grubu ile farklı konsantrasyonlar arasında anlamlı fark gösterirken, konsantrasyonlar arasında fark bulamamıştır. Gene 72 saatte de benzer sonuç elde

etmiştir. Graziani çalışmasında konsantrasyonları 2.5x, 3.5x ve 4.2x şeklinde sınıflamış, en yüksek faydayı 2,5x' de bulunduğunu ama istatiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmiştir (33). Graziani'nin çalışmamızdan önemli bir farkı TZP' yi aktive ederek uygulamasıdır. Graziani sadece aktive edilmiş plazmada bile hücre üremesinde artış elde etmiştir (33). Çalışmamız Graziani'nin çalışması ile benzerlik göstermesine karşın farklılıklarımız vardır. Biz TZP'yi santrifüj ile hazırladık ve aktive etmeden uyguladık. Konsantrasyon oranlarından önce bir denekte eşik değerler ile TZP'nin diğer konsantrasyonlarını karşılaştırmayı hedef aldık, daha sonra diğer deneğin TZP konsantrasyonunu ilk deneğe oransal olarak eşitleyip ikisini karşılaştırdık. Çalışmamızın bir sonraki aşamasında aktive edilmiş ve edilmemiş TZP'leri karşılaştırmayı eklemek gerektiğini düşündük.

Krasna ve ark. insan dermal fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu in-vitro olarak platelet jel ile uyarmaya çalışmışlar. Çalışmada 272 g'de 7 dakikalık süre ile ilk aşama santrifüjü yapmışlar. 1288 g'de 7 dakikalık süre ile de 2. santrifüjü yapmışlar. Elde ettikleri TZP'lerden platelet jel elde etmek için kalsifiye trombin kullanmışlardır. Çalışmada fibroblast proliferasyonunu değişik platelet jel konsantrasyonlarında değerlendirmişlerdir. Platelet jel için 0, 0.2, 2, 10, %20 şeklinde artan konsantrasyonları kullanmışlardır. %20'lik konsantrasyonda en yüksek fibroblast proliferasyonunu elde etmişlerdir. Ayrıca çalışmada yer almamakla beraber %100'lük konsantrasyonda daha fazla fibroblast sitümlasyonu elde ettiklerini belirtmektedirler (61). Aynı çalışmada TZP'nin proliferasyon ve morfoloji üzerinde herhangi bir sitotoksitesini görmemişlerdir. Dondurulmuş TZP'nin ve kalsifiye trombinin de hücre stimülasyonunu sağlayabildiğini düşünmüşlerdir (61). Bu sonuç önemlidir. Çünkü; gelecekte TZP'nin dondurulmuş halde buz dolaplarında saklanabilmesi için önemli bir bulgu olacaktır. Ayrıca trombinin de fibroblast mitojenitesinde potent bir etkisi olduğunu düşünmektedirler (61).

Xian ve ark. yaptıkları çalışmada TZP'nin keratinosit ve fibroblastlar üzerinde konsantrasyon bağımlı etkisini incelemişlerdir. Keratinosit ve fibroblastları hazırladıktan sonra %10 ve %20'lik TZP içinde 3 gün boyunca yatırarak değerlendirmesini yapmışlardır. Keratinosit ve fibroblastların büyüme özelliklerini, migrasyon özelliklerini, ekstraselüler matriks gen ekspresyonunu, solubl faktör sekresyonunu

değerlendirmişlerdir. %10'luk TZP uygulandığında fibroblast ve keratinositlerin yara iyileşmesi potansiyelinin olumlu etkilendiğini bulmuşlardır (62). Çalışmada %10 ve %20 TZP oranlarının detayı belirgin değildir. TZP'nin artan konsantrasyonlarda etkinliğinin değerlendirilmesi açısından bakıldığında; %10 TZP'ye cevabın dokuda yeniden yapılanmayı arttırdığı, %20 TZP'ye cevabın inflamasyonu ve kollajen birikimini arttırdığını göstermişlerdir (62). Bu çalışma; akut ve kronik yaralarda değişik yara fizyolojisi ve iyileşme dinamiği olduğu için konsantrasyon farklarının farklı yara aşamalarında kullanılabileceğini düşündüren bir çalışma olmuştur.

Yoshida ve ark. yaptıkları çalışmada TZP'nin artan konsantrasyonlarda "Anterior Cruciate Ligament" hücreleri üzerindeki etkilerini incelemişler. TFP, 1x, 3x, 5x trombosit zenginleştirme oranlarını kullanmışlar. Trombositlerin düşük konsantrasyonlarda hücreler üzerinde olumlu etkilerini görürken, yüksek konsantrasyonlarda hücreler üzerinde olumsuz etkileri olduğunu görmüşlerdir (59). Çalışmamızda da benzer sonuçları düşünürsek trombositlerin eşik değerini belirlemek önemlidir. Burda eşik değeri tespit ederken; trombosit sayısı mı?, konsantre edilme oranı mı? karşılaştırmasını yaptığımızda konsantrasyon oranının etkinlik değerlendirmede daha önemli olduğunu görüyoruz. Yoshida'nın çalışmasında 5x zenginleştirme oranına sahip TZP'de trombosit sayısı 615.000/mm³ olarak çıkmıştır (59).

Patrick Sadoghi ve ark. yaptıkları çalışmada "rotator cuff" fibroblastlar üzerinde farklı konsantrasyonlarda TZP'nin etkilerini incelemişler. 1x, 5x, 10x zenginleştirme oranlarını kullanmışlar. 1x ve 5x oranlarında fibroblastların proliferasyonunda daha efektif bir artış tespit etmişler. Özellikle 5x oranında artmış hücre üremesi tespit etmişler. 5x oranında ki zenginleştirmeyi sonraki çalışmalarda kullanmayı düşünmüşlerdir (60).

Mazzucco L ve ark. yaptıkları çalışmada platelet konsantrasyonları, büyüme faktör konsantrasyonları ve klinik etkinlik arasında ilişkinin net olmadığını bulmuşlar. Yaptıkları çalışmada platelet konsantrasyonları ile büyüme faktörü konsantrasyonları arasında bir korelasyon olmadığını bulmuşlardır (35).

Lee JW ve ark. yaptığı çalışmada 4,25x trombosit konsantrasyonu elde etmişler. Çalışmada PDGF-AB, PDGF-BB ile TGF-Beta'nın, inaktive ve aktive TZP gruplarında tam kana göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. TZP'nin büyüme faktörleri açısından daha zengin olduğunu belirtmişlerdir. Trombosit aktivasyonu için kalsiyum klorür kullanmışlar (36).

Bu araştırmacılar iki aşama santrifüj yapmışlar, ilk santrifüjlerini 2000 g ve 3 dakika, ikinci santrifüjlerini 3000 g ve 5 dakika hızı ve süresinde yapmışlardır. İnaktive ve aktive TZP'lerde fark olmamasının nedeni, inaktive TZP grubunda santrifüj stresine bağlı trombositlerin erken aktive olmaları olabilir.

Amable PR ve ark. yaptıkları çalışmada TZP hazırlamada ideal hız, ideal santrifüj süresi ve ideal sıcaklığı bulmayı amaçlamışlardır. Çok sayıda santrifüj hızı denemeleri sonucunda ilk aşama santrifüj için 240-300 g ve 5-8 dakikalar arasında en iyi konsantrasyonları yakalamışlar ve sonuçta 300 g'de 5 dakika santrifüjün ilk aşama santrifüj için ideal olduğunu söylemişlerdir. İlk aşama için elde ettikleri TZP'yi yine değişik 11 hız ve sürelerde, sabit ısıda (12 C derece) denemişler. Denemeler sonucunda ikinci santrifüj için ideal olarak 700 g ve 17 dakikayı belirlemişler. Bu çalışmada ortam ısının çok önemli olmadığını ve oda ısında TZP hazırlamanın yeterli olabileceğini söylemişlerdir (27). Amable PR ve ark. çalışmasında antikoagülan olarak sitrat kullanmışlardır (27). Biz çalışmamızda TZP hazırlama işlemlerini oda ısında gerçekleştirdik.

Nagata MJ ve ark. tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 2 grupta TZP hazırlamışlar. İlk santrifüjde 160 g ve 6 dakika süre ile santrifüj yapmışlar, ikici aşama santrifüjde 400 g ve 15 dk süre ile santrifüj yapmışlar. Hazırladıkları TZP'lerle iki grubu karşılaştırmışlar. Çift santrifüj yaptıklarında daha yüksek konsantrasyonlar elde etmişler. Ayrıca TZP'lerdeki trombosit morfolojilerini incelemişler. Çift santrifüj yapılmış ve yüksek konsantrasyon bulunan gruplarda; trombositlerde şekil, büyüklük, boyanma karakteristiğinde, granüllerin dağılımında, vakoullerin oluşumunda değişiklikler olduğunu görmüşler. Bu görüntülerin pre-matür aktivasyonun göstergesi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu durumunda TZP hazırlanırken büyüme faktörlerinininsantrifüjde üst kısımda kalıp TZP'nin büyüme faktörlerinden fakir hale

gelmesine neden olacağını iddia etmişlerdir (37). Ayrıca fazla pipetleme (38, 39) ve kullanılan antikoagülanın da pre-matür aktivasyona neden olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (15, 40).

Hazırlık sırasında TZP içeriğine lökositleri katmamak gerekmektedir. Mümkün olduğunca lökositlerin ayrı tutulmasının gerekliliği lökositlerin proinflamatuvar potansiyellerinden kaynaklanmaktadır (41, 42). Sundman EA ve ark. lökositlerin TZP’de katabolik profili arttırdığını iddia etmişlerdir. Fakat günümüzde TZP’deki lökosit içeriği ile klinik etkileri arasında ki ilişkiyi gösteren in vivo bir çalışma bulunmamaktadır (42). Bizim çalışmamızda hazıranmış olan TZP’lerde ortalama lökosit sayısı $1300/\text{mm}^3$ olarak çıkmıştır, bu miktarın fazla olmamakla beraber etkisini incelemek için ayrı detaylı çalışmalar gerekmektedir.

Amable ve ark. göre TZP’nin içinde 12 faktör ve sitokinler vardır. Bu faktörlerden IGF-1’in zaten plazmada mevcut olduğunu söylemişlerdir. Trombositleri aktive etmekle IGF-1 düzeylerinin pek etkilenmeyeceğini iddia etmişlerdir (27). Bizim çalışmamızda trombositler aktive edilmemiştir. IGF-1 düzeylerine baktığımızda kontrol grubunda minimum düzeyde kalmış ancak hücre içeren ve içermeyen tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiki açıdan çok anlamlı artışlar saptanmıştır. Kontrol grubu hücre kültürlerine TZP uygulanmadığı için plazma verilmemiştir, diğer tüm gruplarda plazma bulunduğu için, IGF-1 düzeylerinin kontrol grubu hariç diğer tüm gruplarda yüksek çıkması beklenen bir bulgudur.

Bausset O ve ark. el yapımı TZP ürününün formülasyonunu ve depolanmasını anlatan bir çalışma yapmışlar. Bu çalışmada iki aşamalı santrifüj (ilk aşamada 130g ve 15 dakika (soft spin), ikinci aşamada 250 g ve 15 dakika (hard spin)) ile 10 ml kandan 1ml TZP hazırlamışlardır (43). TZP içinde bir miktar lökositin kalabildiği ancak bir miktar lökosit bulunmasının büyüme faktörlerinin salınımına önemli etkilerinin olmadığını düşünüyor (44, 45). Biz çalışmamızda yaklaşık 8 cc tam kandan 0.8 cc TZP elde ettik. Birinci ve ikinci spinlerimiz aynı sürelerde, farklı rcf (g) de uygulandı, ilk aşamada 180 g, ikinci aşamada 190 g hızları kullandık.

Yazar aynı çalışmada antikoagulan olarak ACD-A kullanmış. TZP'nin stabilizasyonunu değerlendirmede P-selektin ekspresyonuna bakmış. Hazırlandıktan sonra ilk 3 saat içinde TZP nin stabil olduğunu ve bunu 6 saate kadar sürdürdüğünü göstermiş, 6 saatten uzun süre bekleyen TZP'de büyüme faktörlerinin ortama salındığını belirtmiş (43). Biz çalışmamızda; TZP'lerin hazırlanması ile çalışma gruplarına uygulama arasında geçen süreyi ortalama 2 saatte tuttuk. Pratikte TZP uygulamasında da benzer şekilde hazırlanan TZP'nin çok fazla bekletilmeden uygulanmasının etkinlik açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Bausset O ve ark. TZP hazırlanırken hız artışının konsantrasyonu arttırmada çok avantaj sağlamadığını, 400 g'ye kadar anlamlı artışın olduğunu ancak daha yukarısında etkili olmadığını iddia ediyor. Ayrıca yüksek hızlarda trombositlerde yaklaşık %36 oranında oto-agregasyon olduğunu söylüyor. Yazar, elektron mikroskopu ile düşük santrifüj hızlarında yüksek santrifüj hızlarına göre trombositlerde stabilitenin daha fazla korunduğunu göstermiştir. Plateletlerin; oto-agregasyonunun gösterilmesi, agoniste karşı olan reaksiyonunun azalması ve plateletlerin elektron mikroskopunda istirahat pozisyonundan aktive morfoljiye geçişini göstermekle aktivasyon değerlendirmesi yapmışlar (43). Biz platelet aktivasyonunu çalışma gruplarında büyüme faktörlerinin ölçümü ile saptamaya çalıştık, çalışmamızda trombositlerin erken aktive olmadığını göstermek için yeterli değerlendirme verisi yoktur, çalışmamıza trombosit aktivasyonun gösteren yöntemlerle desteklenmesi için ek testler ilave etmeyi planlıyoruz.

TZP çalışmalarındaki bulgular düşük santrifüj hızlarının daha iyi trombosit fonksiyonu sağlandığını göstermektedir. Çalışmalardaki trombosit konsantrasyon oranı ile büyüme faktörü salınımı arasındaki korelasyona baktığımızda; PDGF-AB düzeylerinin korelasyon gösterdiğini ancak TGF-beta1 ve VEGF düzeylerinin korelasyonunun olmadığını görüyoruz (43). Çalışmamızda da benzer şekilde PDGF-AB düzeyleri ve TZP konsantrasyonu arasında bir korelasyon bulunmuş ancak aynı durum TGF-beta1 ve VEGF düzeyleri için geçerli olmamıştır.

Jeong Mok Cho ve ark. platelet sayısının TZP'nin biyolojik aktivitesi açısından yeterli bir marker olmadığını söylemişlerdir (46). Bu görüşe çalışmamızda desteklenmektedir. Daha yüksek hızlarda daha yüksek konsantrasyonlarda trombosit elde edilebilmektedir.

Ancak erken aktivasyona bağılı olarak büyüme faktörlerinin salınımı olacağından biyolojik açıdan etkinliği azalmış TZP elde edeceğimizi söyleyebiliriz. TZP'nin biyolojik olarak aktivitesinin en önemli ve büyük göstergesi içerdiği büyüme faktörü seviyeleridir (47). Ancak büyüme faktörlerinin hangi aşamada salınmasının daha etkin bir sonuç sağlayacağı tartışma konusudur.

P-selektin membran seviyelerinin ölçümü ve büyüme faktörü salınımlarının ölçülmesi TZP etkinliğinin ve eğer depolanıyorsa depolandığı sırada etkinliğini koruduğunun önemli göstergeleridir. Uzun süreli depolamalarda P-selektin seviyeleri artmaktadır (48).

Michael Merolla ve ark. yaptıkları çalışmada 150, 200, 300, 500 g' lerde santrifüj yaparak TZP hazırlamışlar, sonuçları tam kandaki trombosit sayısı ile karşılaştırmışlar. Light Transmission Aggregometry ile trombosit agregasyonunu ölçmüşler. Santrifüj hızını arttırmanın daha aktif olan büyük trombositlerin TZP den uzaklaşmasına, kırmızı kan hücrelerinin arasına itilmesine neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (49, 50). Büyük plateletler metabolik olarak daha aktif ve pro-trombotiktir (53). "The British Society for Haematology" hazırlamış olduğu kılavuzda TZP hazırlanması ile ilgili standartlar ortaya koymuştur, bu kılavuza göre TZP hazırlamak için ideal hız ve süre 170 g – 10 dakikadır (51). Michael Merolla ve ark. en çok 150 g – 10 dakika hız ve süresini kullanmıştır. Bizde kendi yaptığımız ön çalışmada çeşitli hızlarda ve sürelerde denedikten sonra yeterli konsantrasyonu elde ettiğimiz en düşük hızlar olan 180-190 g hızı santrifüj işleminde tercih ettik.

Araki ve arkadaşları 230 ve 270 g hızlarında 10 dakika süre ile ilk aşama santrifüj yapmışlar. İkinci aşamada 2300 g hızında 10 dakika süre ile santrifüj yapmışlar. Bulgularında ikinci santrifüj sonrası bir grup trombositleri kaybettiklerini yada plateletlerin agrege olduğunu iddia ediyorlar (54). Kan komponentlerinin gravitelerine bakıldığında; kırmızı kan hücreleri en yüksek graviteye 1.055 değeri ile sahiptir. Beyaz kürelerin gravitesi 1.063-1.085, plateletlerin gravitesi 1.032, tam kanın gravitesi; erkek için 1.055-1.060, kadın için 1.050-1.056, plazmanın gravitesi 1.025-1.029, serumun spesifik gravitesi 1.024-1.028 arasında değişmektedir (55). Değişik santrifüj hızları ile bu komponentler birbirinden ayrılıyor. Ancak zahmetli ve pahalı filtreleme yöntemleri

kullanmadan her ayırmadan sonra hücre kontaminasyonunu önlemek mümkün değildir (56). Bu nedenle trombositleri %100 içeren tek yol tam kandır. Platelet zenginleştirme işlemleri sırasında mutlaka bir miktar platelet kaybedilir. Kişilerin spesifik platelet graviteleri farklılıklar gösterebilir. Bu yüzden aynı spin ve süre ile yapılacak santrifüj işlemlerinde aynı sonuçları elde edemeyiz. Bu yüzden ideal bir protokol sağlamak istiyorsak bu kişiye özel, kişi bazında olmak zorundadır (54).

Roy S ve ark. yaptıkları çalışmada endotelial hücre kültürleri üzerinde platelet rich fibrin matrix etkilerini incelemişler. İskemik yaralarda anjiyogenez üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile yapmışlar. PDGF ve TGF seviyelerinin yüksek olduğunu ancak hücrelerin proliferasyonunda bunula ilgili bir korelasyon bulamamışlar. Ancak PDGF’i ve VEGF’i nötralize edecek ajanlarla nötralize ederek değerlendirmişler. PDGF nötralize edildiğinde endotelial hücrelerin proliferasyonu etkilenmemiş. Ancak VEGF nötralize edildiğinde anlamlı şekilde endotelial hücre proliferasyonları düşmüş. TZP’nin etkisini sadece saldığı birkaç büyüme faktörü düzeyine bakarak değerlendirmemek gerekmektedir (57).

Foster ve ark. yaptıkları çalışmada TZP ürünlerini klasifiye etmişlerdir. Trombositten Zengin Plazma, Trombositten Zengin Jel, Trombositten Zengin Konsantre, Trombosit Salgısı ve Trombositten Zengin Hazırlanmış Büyüme Faktörü Salgısı şeklinde isimlendirmeler yapmışlardır (58). TZP’de ortalama 1.000.000/mm³ trombosit olması gerektiğini ileri sürmüş ve iyileşmeyi artırıcı etki için gerekli eşik değeri olduğu iddia edilmiştir (29, 58). Bugözüse katılmayanlar vardır, bizde eşik değeri mm³ teki trombosit sayısı değil, konsantre edilen trombosit oranı ile belirlenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Lei H ve ark. antikoagulanların TZP’deki etkilerini incelemişler. Çalışmada heparin, sitrat, ACD-A ve Sitrat Teofilin Adenozin Dipirimidol etkileri incelenmiş. Burada aktivasyonu incelemişler. Aktivasyon için P-selektin seviyelerine, TGF-beta1’in salınımına, hücre proliferasyonuna bakmışlar. Uygulamanın sonunda ACD-A’nın ve Sitrat Teofilin Adenozin Dipirimidol, Heparin ve Sitrata göre platelet bütünlüğünün korunmasında ve erken aktivasyonunun engellenmesinde daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Yine ACD-A ve Sitrat Teofilin Adenozin Dipirimidol içeren TZP’lerde

salınan TGF-beta1 düzeylerinin daha fazla olduğunu ve insan kemik iliği hücrelerinde proliferasyonu daha fazla arttırdığını göstermişlerdir. ACD-A ve Sitrat Teofilin Adenozin Dipirimidol TZP hazırlamada kullanılacak antikoagülanlar içinde daha önde durmaktadırlar (52). Bizimde çalışmamızda ACD-A kullanımını tercih etme nedenlerimizden birisi bu görüş olmuştur. Araki J ve ark. yaptıkları çalışmada antikoagülan olarak EDTA ve ACD-A kullanmışlar, EDTA'nın platelet agregasyonunu daha iyiengellediğini iddia etmişlerdir (54).

7. SONUÇ

Trombositten Zengin Plazma (TZP) günümüzde Kardiyovasküler Cerrahi, Ortopedi, Üroloji, Maksillofasyal Cerrahi, Diş Hekimliği, Spor Hekimliği, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu kadar geniş kullanım alanı olan TZP uygulamaları ile ilgili etkinlik, standardizasyon, hazırlama şekilleri adına pek çok çalışma devam etmektedir. Çalışmamızda farklı iki donörden hazırlanmış aynı konsantrasyondaki TZP' nin fibroblast hücre kültürüne uygulandığında etkilerinin ne olacağını inceledik.

Bu amaçla iki farklı donörden alınan tam kanlar ile çift aşama santrifüj yaparak TZP'ler elde ettik. TZP'leri iki donörde de 4 farklı gruba bölerek, farklı dilüsyon oranlarında toplamda 8 grup fibroblast hücre kültürüne uyguladık, ayrıca iki donör için fibroblast hücresi içermeyen TZP grupları oluşturuldu. Çalışmada süreyi 24 saat olarak uyguladık. Fibroblast hücre kültürleri'nde mitotik aktivite artışını ve kültürlerde "Fibroblast Growth Faktör (FGF)", "Insulin Like Growth Faktör (IGF)", "Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)", "Transforme Growth Faktör (TGF)", "Platelet Derived Growth Faktör (PDGF-AB)" düzeylerinin ölçümelerini ve bu düzeylerin TZP konsantrasyonları ile korelasyonunun olup olmadığını değerlendirdik.

One Way Anova ve T-Testi ile istatistiksel analizler yaptık. Bu testler sonucunda TZP uyguladığımız çalışma grupları kontrol grubuna göre çok anlamlı şekilde mitotik aktivite artışı gösterdi. Ayrıca TZP uygulanan çalışma grupları, TFP uygulanan çalışma gruplarına göre anlamlı mitotik aktivite artışı gösterdi. Trombosit konsantrasyonu ve büyüme faktörleri açısından fakir olan 2 grupta proliferasyon artışını kontrol grubuna göre anlamlı olmadığını gördük. TZP uygulanan çalışma gruplarının alt gruplarına baktığımızda; TZP'nin %47 oranında dilüe edildiği yani yaklaşık 1.5-1.8 kat konsantrasyonların elde edildiği grupların istatistiksel açıdan kontrol grubuna oranla anlamlı mitotik aktivite artışının olduğunu tespit ettik. Daha sonra, yaklaşık olarak 3.5 kat konsantrasyonlar elde ettiğimiz dilüsyon yapılmayan gruplarda istatistiki açıdan kontrol grubuna göre anlamlı mitotik aktivite artışı tespit ettik. Dilüsyon yapmadığımız grup ve %47 dilüsyon yaptığımız gruplarda, %22 dilüsyon yaptığımız gruba göre anlamlı mitotik aktivite artışı gözlemlendi. Bu sonuç her iki donör gruplarında da aynıydı.

Daha çok konsantre grubun orta konsantre gruptan daha etkin olması beklediğimiz bir etki olmakla beraber, az konsantre grubun orta konsantre gruptan daha fazla etkili olması beklenmedik bir sonuç oldu. Bu sonucun, çalışma sırasında olabilecek pipetaj kusuru, dilüsyonda kusur gibi teknik hatalardan kaynaklanabileceğini düşündük. Ancak her iki donörde de aynı sonuçların çıkması TZP etkinliğini değerlendirmede, kişinin trombosit sayısının değil, konsantrasyon oranının daha önemli olabileceğini düşündük. Daha fazla donörle çalışmayı tekrarlamamızın gerekli olduğunu, konsantrasyon grupları arasındaki farkı netleştiren bulgular çıkarabileceğini düşünmekteyiz.

Büyüme faktörü düzeyleri incelendiğinde; TZP konsantrasyon artışı ile korelasyonu olan büyüme faktörünün PDGF-AB'nin olduğunu gördük. Diğer büyüme faktörlerindeki artışların konsantrasyon artışı ile korelasyonu saptanmamıştır. IGF-1'in düzeyleri kontrol grubu hariç tüm gruplarda artmış bulundu. Ancak IGF-1'in trombositlerden ziyade plazma kaynaklı oluşu bu düzeylerin trombositlerden salınan IGF-1'e bağlı olmadığını düşündürdü.

TZP'nin eşik değerde konsantre olmasının etkinliği için yeterli olduğuna inanıyoruz. Ancak eşik değerin invivo olarak ne olacağı konusunda daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda iki farklı donörden alınan kanların benzer sonuçlar verdiğini gördük, iki donörün trombosit sayıları arasında yaklaşık %20 oranında fark olması nedeni ile zenginleştirme sırasında da farklar oluştu. Ancak bu farklar TZP etkinliği açısından bir fark yaratmadı. Kişinin kanındaki trombosit miktarının iyileşme için gerekli faktörleri ve işlevleri sağlayacak düzeyde olduğunu, daha çok trombosit olan kanların daha fazla iyileşme sağlamadığı, trombosit sayısı düşük olan bireylerde trombositlerin aktivasyonu, etkinliği, büyüme faktörü içeriğinin ona göre farklılık gösteriyor olabileceğini düşündük.

TZP; kolay elde edilebilen, yan etki profili düşük otolog bir kan ürünüdür. Plastik Cerrahi alanında özellikle yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Yara iyileşmesinin kilit hücrelerinden olan trombositleri ve büyüme faktörlerini yüksek konsantrasyonlarda içermektedir. Çalışmamızda TZP'nin fibroblast hücrelerinde proliferasyonu arttırdığını ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik. TZP nin hazırlanmasında kişideki trombosit sayısının katlarının

önemli olduğunu, mikrolitredeki trombosit sayısını çok arttırmanın önemli olmadığını düşündük. PDGF-AB düzeylerinin TZP’de konsantrasyon artışı ile korele olduğunu gördük. Ancak yinede kendi TZP’sini hazırlayanlara referans olabilmesi ve etkinliğin daha da iyi açıklanabilmesi için çalışmamızındetaylandırılması ve ileriye götürülmesi gerektiğini düşünüyoruz.

8.KAYNAKLAR

- 1.Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55(11):1294–1299.
- 2.Boyapati L, Wang HL. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent* 2006; 15(2): 160–170
- 3.Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(6): 147–159
- 4.Joseph E, Hartwig J. Megakaryocyte and platelet structure. In: Hoffman R, editor. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4 ed. Florida: Churchill Livingstone; 2005. p. 1873–1880
- 5.Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12(5): 261–273
- 6.Plow E, Abrams C. The Molecular basis for platelet function. In: Hoffman R, editor. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4 ed. Florida: Churchill Livingstone; 2005. p. 1881–1884
- 7.Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7(1): 52–62
- 8.Hom DB. Growth factors and wound healing in otolaryngology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 110(6): 560–564
- 9.Ma Y, Zhao H, Zhou X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(6): 586–599
- 10.Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg [Am]* 2004; 29(4): 551–563
- 11.Yeo SW, Kim SW, Suh BD, et al. Effects of platelet-derived growth factor-A on the healing process of tympanic membrane perforation. *Am J Otolaryngol* 2000 ;21(3): 153–160
- 12.Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165(6): 728– 737
- 13.O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99(1): 80–84

- 14.Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L, et al. Growth factors in tympanic membrane perforations. *Am J Otol* 1998; 19(4): 428–434
- 15.Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10(4): 225–228
- 16.Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(6): 638–646
- 17.Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2002; 68(3): 22–24
- 18.Floryan KM, Berghoff WJ. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J* 2004; 80(4): 668– 674
- 19.Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4–15
- 20.Bose B, Balzarini M. Bone graft gel: Autologous growth factors used with autograft bone for lumbar spine fusions. *Adv Ther* 2002;19(4): 170-175
- 21.Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, et al. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion* 1999; 39: 144–148
22. Gonzales DJS, Bolaina EM, Bahena NIT. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Inter J pept.* vol. 2012. doi:10.1155/2012/532-519
- 23.Lacci KM, Dardik A. Platelet rich plasma: support for its use wound healing. *Yale journal of biology and medicine.* 2010;83(1):1-9
- 24.Everts PA, Mahoney CB, Hoffman JJ,et all. Platelet rich plasma preparation using three devices: Implications for platelet activation and platelet growth factor release.*Growth factors.* 2006;24(3):165-171
25. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods.* 1986; Vol: 89, Issue 2, Pages 271-277.
26. Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Res Ther.* 2012 Aug 8;14(4):219
27. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, GranjeiroJM,BorojevicR.Plateletrich_plasma_preparation_for_regenerative_medicine:_optimization_and_quantification_of_cytokines_and_growth_factors.*Stem Cell Res Ther.* 2013 Jun 7;4(3):67

28. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:529–535
29. Marx, Robert E. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dentistry* 10(4), December 2001, pp 225-228
30. Peter AM Everts, CB Mahoney, J JML Hofmann, JP Schonberger, H AM Box, A Van Zundert, J TA Knape. Platelet-rich plasma preparation using three devices: Implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors*, 2006; 24(3): 165–171
31. Akhundov K, Pietramaggiore G, Waselle L, Darwiche S, Guerid S, Scaletta C, Hirt-Burri N, Applegate LA, Raffoul WV. Development of a cost-effective method for platelet-rich plasma (PRP) preparation for topical wound healing. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012 Dec 31;25(4):207-13
32. Kasperk CK, Wergedal JE, Mohan S, et al. Interaction of growth factors present in bone matrix with bone cells: effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase. *Growth Factors*.1990;3:147–58.
33. Filippo Graziani, Saso Ivanovski, Silvia Cei, Francesco Ducci, Maurizio Tonetti, Mario Gabriele. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*, 17: 212-9, 2006.
34. Rappl LM. Effect of platelet rich plasma gel in a physiologically relevant platelet concentration on wounds in persons with spinal cord injury *International Wound Journal*, 8: 187-95, 2011.
35. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sang*. 2009 Aug;97(2):110-8.
36. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY, Cho BC, Yang JD, Shin JH. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg*. 2013 Sep;40(5):530-5.
37. Nagata MJ, Messoria MR, Furlaneto FA, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, Deliberador TM, de Melo LG. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma an experimental study in rabbits *Eur J Dent*. 2010 Oct;4(4):395-402
38. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function. *Thromb Haemost*. 1998;79:885–896.

39. Michelson AD. Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood*. 1996;87:4925–4936.
40. Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:1403–1407.
41. van Osch GJ, Bernsen MR, van Buul GM, Koevoet WL, Kops N, Bos PK, Verhaar JA, Weinans H. Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *Am J Sports Med* 2011, 39:2362–2370
42. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet rich plasma.
43. Bausset O, Giraudo L, Veran J, Magalon J, Coudreuse JM, Magalon G, Dubois C, Serratrice N, Dignat-George F, Sabatier F. Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product. *Biores Open Access*. 2012 Jun;1(3):115-23.
44. Gosens T, Peerbooms JC, van Laar W, et al. Ongoing positive effect of platelet-rich plasma versus corticosteroid injection in lateral epicondylitis: a double-blind randomized controlled trial with 2-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2011;39:1200–1208.
45. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2006;34:1774–1778.
46. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58:297–300. discussion 301.
47. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:357–362.
48. Tynngard N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. *Transfus Apher Sci*. 2009;41:97–104.
49. Michael Merolla, BA, Michael A Nardi, BS, and Jeffrey S Berger, MD, MS. Centrifugation Speed Affects Light Transmission Aggregometry. *Int J Lab Hematol*. 2012 February ; 34(1): 81–85
50. Sixma JJ. Methods for platelet aggregation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1972;34:79–95.
51. Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *Journal of Clinical Pathology*. 1988;41:1322–1330.

52. Lei H, Gui L, Xiao R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem.* 2009 Sep;42(13-14):1452-60
53. Bath PM, Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 1996;7:157–161.
54. Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H, Doi K, Yatomi Y, Yoshimura K. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012 Mar;18(3):176-85.
55. Plötner R. *Handbuch der gesamter Hämatologie, Band 11/2. zweiter Halbband, München, Berlin: Urban & Schwanzenberg; 1960. p. 254.*
56. Kurita M, Aiba-Kojima E, Shigeura T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Eto H, Kato H, Aoi N, Yoshimura K. Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122:438.
57. Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, Gnyawali U, Bergdall VK, Sen CK. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen.* 2011 Nov;19(6):753-66
58. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37(11):2259-72
59. Ryu Yoshida, Mingyu Cheng, and Martha M. Murray Increasing Platelet Concentration in Platelet-Rich Plasma Inhibits Anterior Cruciate Ligament Cell Function in Three- Dimensional Culture Department of Orthopaedic Surgery, Children's Hospital Boston, Hunnewell 2, 300 Longwood Ave, Boston, Massachusetts 02115 *J Orthop Res.* 2014 February ; 32(2): 291–295. doi:10.1002/jor.22493.
60. Sadoghi P, Lohberger B, Aigner B, Kaltenegger H, Friesenbichler J, Wolf M, Sununu T, Leithner A, Vavken P. Effect of platelet-rich plasma on the biologic activity of the human rotator-cuff fibroblasts: A controlled in vitro study. *J Orthop Res.* 2013 Aug;31(8):1249-53.
61. Krasna M, Domanović D, Tomsic A, Svajger U, Jeras M. Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2007 Sep;16(3):105-10
62. Xian LJ, Roy Chowdhury S, Bin Saim A, Bt Hj Idrus R. Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cytotherapy.* 2015 Mar;17(3):293-300.